

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**IN VALORIZZAZIONE E GESTIONE DELLE RISORSE**

**AGRO-FORESTALI**

**INDIRIZZO BONIFICA E DIFESA DEL SUOLO**

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLA SOSTANZA ORGANICA**

**NATURALE CON METODICHE DI RISONANZA MAGNETICA**

**NUCLEARE E SPETTROMETRIA DI MASSA**

Docente guida  
Chiar.mo Prof.  
Alessandro Piccolo

Candidato  
Dr. Antonio Nebbioso

Coordinatore  
Chiar.mo Prof.  
Antonio Cioffi

**Anni Accademici 2005-2008**

## INDICE

<b>CAPITOLO 1: IL SUOLO E LA SOSTANZE ORGANICA NATURALE</b>	<b>pg.1</b>
1.1 Il suolo	<b>pg.1</b>
1.2 La sostanza organica del suolo (SOM) e la sostanza organica naturale (NOM)	<b>pg.2</b>
1.3 Le sostanze umiche	<b>pg.4</b>
1.4 Genesi e struttura delle sostanze umiche	<b>pg.5</b>
1.5 Le basi per una conoscenza umeomica	<b>pg.11</b>
 <b>CAPITOLO 2: DISEGNO SPERIMENTALE E OBBIETTIVI DELLA TESI</b>	 <b>pg.14</b>
 <b>CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI</b>	 <b>pg.18</b>
3.1 Estrazione e purificazione di acidi umici	<b>pg.18</b>
3.2 Procedura di frazionamento analitico	<b>pg.19</b>
3.2.1. <i>Estrazione della componente organosolubile non legata covalentemente alla matrice</i>	<b>pg.19</b>
3.2.2. <i>Estrazione della componente legata alla matrice con legame estere labile</i>	<b>pg.19</b>
3.2.3. <i>Estrazione della componente legata alla matrice con legame estere forte</i>	<b>pg.20</b>
3.2.4. <i>Estrazione della componente legata alla matrice con legame etere</i>	<b>pg.21</b>
3.3 Solid Phase Extraction (SPE) delle frazioni organiche ORG1, ORG2, e ORG3	<b>pg.21</b>
3.4 Separazione in cromatografia preparativa a esclusione molecolare ad alta prestazione (HPSEC) di residuo finale di frazionamento chimico (RES4)	<b>pg.21</b>
3.5 Analisi elementare	<b>pg.23</b>
3.6 Preparazione di un campione di HA da Lignite puro da metalli e complessazione con quantità note di ioni alluminio e calcio	<b>pg.23</b>
3.6.1. <i>Purificazione del campione da metalli</i>	<b>pg.23</b>
3.6.2. <i>Preparazione delle soluzioni metalliche a concentrazione nota</i>	<b>pg.24</b>
3.6.3. <i>Formazione dei Complessi metallo-umici</i>	<b>pg.24</b>
3.7 Analisi gascromatografica accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS)	<b>pg.25</b>
3.7.1. <i>Derivatizzazione dei campioni</i>	<b>pg.25</b>
3.7.2. <i>Analisi strumentale</i>	<b>pg.26</b>
3.8 Analisi ESI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry) in iniezione diretta e accoppiata a HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) analitica	<b>pg.26</b>
3.8.1. <i>Preparazione dei campioni</i>	<b>pg.26</b>
3.8.2. <i>Cromatografia liquida HPSEC</i>	<b>pg.27</b>

3.8.3.	<i>Analisi strumentale</i>	pg.27
3.9	Spettroscopia NMR	pg.28
3.9.1.	$^{13}\text{C}$ -NMR allo stato solido	pg.28
3.9.2.	NMR in soluzione	pg.29

## **CAPITOLO 4: CARATTERISTICHE E ASPETTI GENERALI DEI CAMPIONI STUDIATI**

		pg.32
4.1	Aspetto generale	pg.32
4.2	Solubilità	pg.33
4.3	Analisi elementare	pg.34
4.4	Rese del processo di frazionamento sequenziale	pg.35
4.5	Rese del frazionamento HPSEC del residuo finale (RES4) e aspetto del cromatogramma	pg.36

## **CAPITOLO 5: RISULTATI E DISCUSSIONE: ANALISI MS E NMR DI HA VICO**

		pg.38
5.1	Spettrometria di massa di HA Vico (RES0)	pg.38
5.1.1.	<i>Generalità</i>	pg.38
5.1.2.	<i>Ottimizzazione del metodo</i>	pg.39
5.1.3.	<i>RES0: Analisi LC-MS, Aspetto generale</i>	pg.43
5.1.4.	<i>RES0: Analisi LC-MS, Analisi qualitativa</i>	pg.45
5.1.5.	<i>RES0: Analisi LC-MS, Categorie di molecole</i>	pg.46
5.1.6.	<i>RES0: Analisi LC-MS, Caratterizzazione quantitativa delle frazioni</i>	pg.48
5.1.7.	<i>RES0: Analisi LC-MS, Rese quantitative analitiche strumentali</i>	pg.50
5.2	Spettroscopia $^{13}\text{C}$ CP-MAS NMR di HA Vico (RES0):	pg.53
5.3	Analisi di estratti di frazionamento (ORG1, ORG2, ACQ2, ORG3)	pg.54
5.4	Analisi MS di componenti libere organosolubili (ORG1)	pg.55
5.4.1.	<i>Aspetti generali</i>	pg.55
5.4.2.	<i>ORG1: Analisi GC-MS, Aspetti qualitativi</i>	pg.56
5.4.3.	<i>ORG1: Analisi GC-MS, Aspetti quantitativi</i>	pg.59
5.4.4.	<i>ORG1: Rese del processo di analisi</i>	pg.63
5.5	Spettroscopia NMR di componenti libere organosolubili (ORG1)	pg.68
5.5.1.	<i>ORG1: Spettroscopia <math>^{13}\text{C}</math> NMR in fase solida</i>	pg.68
5.5.2.	<i>ORG1: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione</i>	pg.69

5.5.3.	<i>ORG1 Spettroscopia bidimensionale in soluzione omo-ed eterocorrelata</i>	<b>pg.72</b>
5.6	Analisi di componenti debolmente legate alla matrice organosolubili (ORG2) e idrosolubili (ACQ2)	<b>pg.78</b>
5.7	Analisi MS di componenti organosolubili debolmente legate alla matrice (ORG2)	<b>pg.79</b>
5.7.1.	<i>ORG2: Analisi GC-MS, Aspetti qualitativi</i>	<b>pg.79</b>
5.7.2.	<i>ORG2: Analisi GC-MS, Aspetti quantitativi</i>	<b>pg.82</b>
5.7.3.	<i>ORG2: Analisi GC-MS, Rese del processo di analisi</i>	<b>pg.84</b>
5.8	Spettroscopia NMR di componenti organosolubili debolmente legate alla matrice (ORG2)	<b>pg.89</b>
5.8.1.	<i>ORG2: Spettroscopia <sup>13</sup>C NMR in fase solida</i>	<b>pg.89</b>
5.8.2.	<i>ORG2: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione</i>	<b>pg.90</b>
5.8.3.	<i>ORG2: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione</i>	<b>pg.91</b>
5.9	Analisi MS di componenti idrosolubili debolmente legate alla matrice (ACQ2)	<b>pg.95</b>
5.9.1.	<i>Aspetti generali</i>	<b>pg.95</b>
5.9.2.	<i>ACQ2: Analisi LC-MS, Aspetti qualitativi</i>	<b>pg.96</b>
5.9.3.	<i>ACQ2: Analisi LC-MS, Aspetti quantitativi</i>	<b>pg.100</b>
5.9.4.	<i>ACQ2: Rese e vantaggi del processo di analisi</i>	<b>pg.102</b>
5.10	Spettroscopia NMR di componenti idrosolubili debolmente legate alla matrice	<b>pg.104</b>
5.10.1.	<i>ACQ2: Spettroscopia <sup>13</sup>C NMR in fase solida</i>	<b>pg.104</b>
5.10.2.	<i>ACQ2: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione</i>	<b>pg.105</b>
5.10.3.	<i>ACQ2: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione</i>	<b>pg.107</b>
5.11	Analisi MS di componenti organosolubili fortemente legate alla matrice (ORG3)	<b>pg.110</b>
5.11.1.	<i>Aspetti generali</i>	<b>pg.110</b>
5.11.2.	<i>ORG3: Analisi GC-MS, Aspetti qualitativi</i>	<b>pg.111</b>
5.11.3.	<i>ORG3: Analisi GC-MS, Aspetti quantitativi</i>	<b>pg.115</b>
5.11.4.	<i>ORG3: Rese del processo di analisi</i>	<b>pg.118</b>
5.12	Spettroscopia NMR di componenti organosolubili fortemente legate alla matrice (ORG3)	<b>pg.120</b>
5.12.1.	<i>ORG3: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione</i>	<b>pg.120</b>
5.12.2.	<i>ORG3: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione</i>	<b>pg.122</b>
5.13	Analisi MS di residuo finale di frazionamento (RES4)	<b>pg.125</b>
5.13.1.	<i>Aspetto generale</i>	<b>pg.125</b>
5.13.2.	<i>RES4: LC-MS, Analisi qualitativa</i>	<b>pg.125</b>

5.13.3.	<i>RES4: LC-MS, Tempi di eluizione delle molecole</i>	<b>pg.127</b>
5.13.4.	<i>RES4: LC-MS, Caratterizzazione quantitativa delle frazioni</i>	<b>pg.132</b>
5.13.5.	<i>RES4: LC-MS, Rese quantitative analitiche strumentali</i>	<b>pg.137</b>
5.14	<b>Spettroscopia NMR di HA RES4 e frazioni</b>	<b>pg.145</b>
5.14.1.	<i>Aspetti generali</i>	<b>pg.145</b>
5.14.2.	<i>RES4: Spettroscopia <math>^{13}\text{C}</math> NMR in fase solida</i>	<b>pg.145</b>
5.14.3.	<i>RES4: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione:</i>	<b>pg.149</b>
5.14.4.	<i>RES4: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione: HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy)</i>	<b>pg.150</b>
5.14.5.	<i>RES4: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione: Correlation Spectroscopy (COSY) e Total Correlation Spectroscopy (TOCSY)</i>	<b>pg.151</b>
5.14.6.	<i>RES4: Spettroscopia NMR in soluzione: Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)</i>	<b>pg.180</b>
<b>CAPITOLO 6: ANALISI NMR DI COMPLESSI METALLO-UMICI</b>		<b>pg.185</b>
6.1	<b>Introduzione</b>	<b>pg.185</b>
6.2	<b>Risultati: Rigidità molecolare</b>	<b>pg.185</b>
6.3	<b>Risultati: Diffusione molecolare</b>	<b>pg.187</b>
6.4	<b>Discussione</b>	<b>pg.189</b>
<b>CAPITOLO 7: CONCLUSIONI</b>		<b>pg.196</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		<b>pg.202</b>

# CAPITOLO 1

## IL SUOLO E LA SOSTANZA ORGANICA NATURALE

### 1.1 Il suolo

Il suolo costituisce un elemento imprescindibile nell'ecosistema terrestre. Per molti versi, esso si presenta come uno dei sistemi più complessi da studiare. La sua collocazione ecologica di raccordo tra la roccia madre e la vegetazione ne determina la eterogeneità intesa come dicotomia tra la materia organica e minerale. Il suolo è suddiviso in orizzonti a seconda della profondità, con la *lettiera*, ossia il materiale vegetale secco in fase di decadimento, nell'orizzonte superiore, le frazioni inorganiche a diversa granulometria più in profondità e legate alla frazione organica in complessi umo-argillosi.

I complessi umo-argillosi vedono la presenza contemporanea di materiale organico e inorganico legati da fenomeni di adsorbimento e interazione anionico-cationico. A questa caratteristica ripartizione di materia organica ed inorganica sono ascrivibili molte delle proprietà fondamentali del suolo essenziali per l'equilibrio dell'ecosistema.

Le funzionalità di questa preziosa risorsa sono tuttavia costantemente minacciate dalle variazioni ambientali ed antropogeniche. In particolare, l'utilizzo intensivo del suolo in agricoltura si ripercuote negativamente sulla sua qualità. Il dissodamento infatti causa la degradazione della sostanza organica (Soil Organic Matter, SOM) e la mineralizzazione dei nutrienti in essa contenuti determinando a lungo termine l'impoverimento o la totale desertificazione dei terreni agricoli. Questo fenomeno è mitigato solo in parte dall'utilizzo di metodi di gestione *low-tillage* e *no-tillage*, rispettivamente: dissodamento basso e nullo, e l'uso del compost come fertilizzante in luogo delle

sostanze chimiche. Tuttavia urge la definizione e l'applicazione di una nuova strategia globale di più ampio respiro, atta alla salvaguardia della risorsa suolo.

Le problematiche associate alla gestione del suolo si estendono anche al problema dell'emissione dei gas serra, in particolare della CO<sub>2</sub>. L'interazione con la componente minerale, in particolare le argille, da parte della SOM ne rallenta drasticamente lo stress ossidativo e l'attacco da parte dei microrganismi. E' stimato infatti che il suolo funga nel ciclo del carbonio da serbatoio più importante, immobilizzandone una quantità superiore a quanto attribuito alla biomassa globale, ai combustibili fossili, agli oceani o ai massicci montuosi. La sensibilità della politica nei confronti delle problematiche del riscaldamento globale è aumentata sensibilmente nelle ultime due decadi, raggiungendo un risultato importante nella ratifica del protocollo di Kyoto nel 1997, un accordo siglato ad oggi da 182 paesi sul controllo delle emissioni di gas serra. Pertanto, affinché il protocollo sia rispettato, non si può prescindere dalla corretta gestione della SOM, la cui genesi, composizione e reattività è quindi obbiettivo fondamentale della ricerca scientifica.

## **1.2 La sostanza organica del suolo (SOM) e la sostanza organica naturale (NOM)**

La sostanza organica naturale (NOM) è la componente organica presente nel suolo, nei sedimenti e disciolta nelle acque, costituita dal prodotto di decomposizione microbica dei materiali vegetali ed animali, e che evolve verso uno stato a più alta entropia (Hayes & Swift, 1978). Tale processo avviene nella scala temporale di anni, e viene continuamente alimentato dall'arrivo di nuovo materiale con la morte degli organismi. La NOM è caratterizzata quindi da una spiccata eterogeneità, e la sua composizione è variabile in funzione delle caratteristiche climatiche, morfologiche e della popolazione faunistica, vegetale e microbiologica locale. Essa gioca un ruolo fondamentale per l'ecosistema per la capacità di limitare l'impatto di agenti inquinanti metallici e organici e nel contrastare fenomeni di degradazione ambientale (Manahan, 2001; Ponte, 2003). Essa

viene anche denominata *Humus*. Nel suolo, il cosiddetto *humus* è responsabile per un ammontare stimato a più del 65% della sostanza organica del suolo (SOM).

Inoltre vanno presi in considerazione i residui organici non ancora degradati, di origine animale e vegetale (inclusa la *lettieria*), i composti di biosintesi non ancora completamente trasformati quali lipidi, proteine, acidi nucleici, polisaccaridi e lignine, la biomassa microbica e le sostanze idrosolubili, in larga parte acidi organici idrossilati e carboidrati semplici. Lo studio della frazione umica della SOM non dovrebbe essere avulsa dal contesto in cui tali sostanze si trovano in natura. Essa infatti interagisce intimamente con tutte le altre componenti, svolgendo nei loro confronti una funzione protettiva che ne consente l'accumulo e la stabilità su larga scala temporale. Le proprietà della SOM sono quindi un insieme di interazioni di difficile approccio analitico e per questo motivo ancora in larga parte sconosciute.

Tutta la sostanza organica del suolo ha una dinamica che segue un andamento puramente entropico, non intervenendo alcuna trasformazione a dispendio di energia. Il decadimento accompagna quindi il materiale organico dallo status di sostanza vegetale nella sua integrità funzionale, attraverso tutti gli stadi intermedi fino a stabilizzarsi nello status di *humus*, la componente più recalcitrante, che in appropriate condizioni può risultare virtualmente eterna. Affinché il processo si compia il ruolo protettivo svolto dalla NOM preesistente è fondamentale. Se ne deduce che la distruzione dell'*humus* determina un momento di discontinuità che può portare a un circolo vizioso e al progressivo impoverimento del suolo nella sua componente organica, fino alla completa mineralizzazione.

La mineralizzazione della SOM produce anidride carbonica, uno dei più importanti gas serra responsabili dell'aumento globale delle temperature. La degradazione della SOM conduce ad un accelerato sbilanciamento dell'equilibrio ambientale con il rischio che il concatenamento degli effetti possa culminare in un punto di non ritorno per l'ecosistema. Il raggiungimento dell'obiettivo di Kyoto quindi non può prescindere da una corretta strategia di gestione della



risorsa suolo attraverso la salvaguardia della sua frazione umica. A tal proposito, la ricerca scientifica si è posta come obiettivo la definizione della genesi, reattività, composizione e architettura molecolare delle sostanze umiche.

### **1.3 Le sostanze umiche**

Nella classificazione tradizionale, l'humus o sostanze umiche (HS) si dividono, in base alla loro solubilità, in acidi fulvici (FA), acidi umici (HA) e umina (HU) (Stevenson, 1994). Tale classificazione è puramente operativa, ovvero non esclude che la composizione di tali frazioni sia parzialmente simile. Gli FA risultano solubili in soluzioni acquose in condizioni acide, neutre e basiche. Essi sono la frazione più spiccatamente idrofila, con indice ossigeno/carbonio intorno a 0.70 con la maggiore acidità, tipicamente tra 640 e 1420 mol.kg<sup>-1</sup>. Gli HA presentano una solubilità funzione del pH della soluzione, tipicamente sono solubilizzati in condizioni alcaline e una volta in soluzione possono essere riprecipitati a pH<3. Gli HA sono più complessi degli FA, hanno un minore valore di acidità compreso tra 560 e 890 mol.kg<sup>-1</sup> e minore contenuto di ossigeno (O/C vicino a 0.5). L'HU ha scarsa solubilità in soluzione acquosa e non è influenzata dal pH. Per tale motivo la sua acidità è modesta. Essa è la componente più inerte delle sostanze umiche, e presenta valori di insaturazione più modesti delle tre frazioni, come evidenziato dal più alto indice H/C intorno a 1.5 rispetto ai valori prossimi a 1.0 di HA e FA (Stevenson, 1994).

Le sostanze umiche hanno numerose proprietà che le caratterizzano ed influenzano le proprietà delle soluzioni acquose con cui sono in contatto, esercitando un effetto di coordinazione dei metalli pesanti normalmente poco solubili (Cheshworth, 2008), hanno un effetto surfattante per la loro natura anfifilica (Jones and Bryan, 1998), e sono in grado di esercitare un effetto di protezione contro la biodegradazione sia su loro stesse sia sulla sostanza organica con cui vengono a contatto, a tal punto che stabilizzano al loro interno anche strutture radicaliche (Tan, 98). Esse interagiscono con la luce visibile, apparendo intensamente colorate, e con un'ampia banda ultravioletta (UV),

esercitando un effetto protettivo nei confronti delle radiazioni più pericolose per la mutazione delle basi puriniche e pirimidiniche (Stevenson, 1994). Le proprietà delle HS sono attribuibili alla loro composizione e alla loro struttura. Per meglio comprendere questi elementi, è necessario conoscere la loro genesi e la loro architettura molecolare.

#### **1.4 Genesi e struttura delle sostanze umiche**

La genesi delle sostanze umiche rimane un argomento alquanto poco chiaro, e il suo approfondimento è particolarmente difficile dati i tempi di formazione notevolmente lunghi che rendono problematica la riproduzione in laboratorio e l'elaborazione di un modello. Molte sono le ipotesi sui meccanismi di formazione che sono state formulate.

La prima teoria riguardo l'origine delle sostanze umiche partiva da un assunto fondamentale, la formazione di un legame covalente tra un azoto aminoacidico, derivante da una proteina proveniente dal pool della SOM e un residuo aldeidico o chinonico originatosi dalla decomposizione microbica e ossidativa della lignina, in una condensazione tipica delle basi di Schiff. Essa è comunemente denominata la teoria della lignina, attribuita a Waksman (Waksman, 1932). Essa in realtà si articola in quattro vie sintetiche una delle quali coinvolge anche i carboidrati derivanti dalla cellulosa degradata dai microrganismi. Essi sarebbero quindi responsabili della demetilazione delle funzioni metossiliche e successivamente dell'ossidazione delle catene alifatiche con la formazione di funzioni carbossiliche. In una rivisitazione della teoria della lignina di Hatcher e Spiker (Hatcher & Spiker, 1988), altri biopolimeri di origine vegetale, come le cutine e le suberine, e microbica come le melanine e le paraffine ad alto peso molecolare sarebbero coinvolte nel processo di degradazione che porta alla formazione dei precursori. Tuttavia quei biopolimeri che sono più resistenti alla degradazione sarebbero responsabili della genesi dell'umina, mentre per gli altri sarebbe il grado di ossidazione che differenzerebbe la formazione di HA piuttosto che FA. La cronologia di formazione sarebbe quindi in ordine HU, HA, FA. Il limite di questa teoria consiste

nella lentezza che le reazioni di formazione di basi di Schiff soffrono alle temperature in cui le sostanze uniche normalmente si formano. Sembra inoltre improbabile che una trasformazione simile avvenga in modo completamente abiotico nel suolo, sistema caratterizzato da una vasta microflora.

Queste considerazioni hanno contribuito alla teoria che si è fatta strada in un secondo momento, come alternativa a quella di Waksman, che prende il nome di teoria dei polifenoli, a cui tra gli altri hanno contribuito in modo sostanziale Flaig, Kononova, Martin e Haider (Flaig, 1966; Kononova, 1966; Flaig, 1988; Haider *et al.*, 1975). Essa postula la reazione enzimatica di prodotti di degradazione dei biopoliesteri come la lignina da parte di miceti, a formare macromolecole. Da reagenti per la condensazione fungerebbero strutture chinoniche provenienti dall'ossidazione di polifenoli, e gli aminoacidi. Una interessante differenza rispetto alla teoria della lignina, sarebbe la diversa cronologia di formazione degli FA, HA e HU, che avverrebbe in questo ordine, quindi opposto alla teoria della lignina sovracitata.

Più recentemente, alla concezione ampiamente condivisa che metteva in primo piano nella formazione delle HS a partire da precursori prevalentemente aromatici, si sono aggiunte ipotesi sulla compartecipazione di residui alifatici al processo di umificazione con formazione di legami esterei di molecole a lunga catena (Grasset & Amblès, 1998a). Acidi grassi lineari, ramificati, insaturi, ossidrilati e alcoli a lunga catena sono prodotti di degradazione delle membrane cellulari, delle cere, di biopolimeri come cutina e suberina. Questo fenomeno contribuirebbe quindi a generare domini idrofobici in cui le sostanze idrofiliche provenienti dalla degradazione dei biopolimeri potrebbero rimanere occluse e quindi protette (Spaccini *et al.*, 2000).

Il limite delle teorie finora descritte, è la difficoltà per una variazione entropica così negativa, portata dalla formazione di macromolecole a partire da componenti semplici, ad avvenire spontaneamente o per catalisi enzimatica semplice, senza un consumo di ATP.

Altre ipotesi per la formazione di strutture più complesse a partire da monomeri semplici riguarda la capacità da parte di laccasi e perossidasi, enzimi di origine fungina, di formare radicali a partire da fenoli. Questi radicali sarebbero poi responsabili dell'attacco elettrofilo a carico di altri radicali fenolici che porterebbe la formazione di legami covalenti C-C. Queste considerazioni sono scaturite da esperimenti di decontaminazione di clorofenoli nel suolo per formazione di legami covalenti con le sostanze umiche (Ahn *et al.*, 2002). Tuttavia, la cinetica della reazione che prevede la reazione di due specie radicaliche sarebbe decisamente svantaggiata dalla bassa concentrazione con cui queste sostanze si riscontrano nelle condizioni in cui avviene il processo di umificazione.

La difficoltà nel definire il fenomeno dell'umificazione nei suoi vari passaggi è un effetto delle numerose variabili che entrano in gioco. Il clima a cui è esposto il suolo determina condizioni di temperatura e umidità molto variabili, la vegetazione preponderante influenza l'acidità del suolo e il materiale vegetale che subisce le trasformazioni enzimatiche e chimiche in questione, la microflora che popola il suolo determina le trasformazioni che avvengono preferenzialmente, la tessitura della parte minerale del suolo determina la superficie di interazione tra i silicati e l'humus, la composizione delle specie cationiche nel suolo può portare variabilità nell'interazione con specie cariche negativamente.

A rendere più complicato lo sviluppo di un modello per il processo di umificazione vi è anche la difficoltà ad analizzare la composizione chimica delle HS vere e proprie. Definire un percorso di cui non si conosce a fondo il punto di arrivo è indubbiamente arduo. Le difficoltà di analisi sono direttamente correlate all'organizzazione della SOM in strutture che svolgono il loro ruolo di protezione della sostanza organica anche e soprattutto su loro stesse. La riduzione della biodisponibilità nei confronti dei microrganismi e dello stress atmosferico si ripercuote negativamente anche sulle tecniche analitiche. Come ulteriore elemento di ostacolo, la SOM è, in virtù della molteplicità delle variabili ambientali e delle reazioni implicate nella loro formazione, uno dei sistemi più eterogenei dell'intero ecosistema.

Per questo la conoscenza della struttura molecolare dell'*humus* è tutt'altro che raggiunta. Sulla scia delle teorie sulla genesi delle HS precedentemente descritte, fin dagli albori dello studio della chimica del suolo si è fatta strada l'ipotesi che si trattasse di molecole ad alto peso molecolare prodotto di reazioni di polimerizzazione di precursori aromatici o chinonici a formare sistemi aromatici policiclici, intervallati da *linker* di tipo alifatico (Kleinhempel, 1970) o sistemi eterogenei formati da subunità a struttura benzenica su cui si sarebbero innestate in modo covalente strutture polipeptidiche, polisaccaridiche o alifatiche, con interazioni non covalenti intercatena a stabilizzare il tutto (Schnitzer, 1972). Per queste ipotesi è stata elaborato un modello di conformazione detto a "gomitolo ripiegato" (Gosh e Schnitzer, 1980) per descrivere la transizione che subirebbero le macromolecole a seconda delle proprietà della soluzione. Valori di pH bassi, alta forza ionica e alte concentrazioni favorirebbero una conformazione ripiegata su se stessa ad alta densità, viceversa in condizioni di pH alto, forza ionica e concentrazione bassa, sarebbe termodinamicamente più stabile una conformazione a lunghe catene lineari di tipo colloidale. L'influenza del pH sarebbe spiegata con la ionizzazione delle funzioni acide che porta repulsione reciproca, mentre la presenza di specie ioniche smorzerebbe le forze coulombiane degli ioni anionici e favorirebbe interazioni tra le porzioni idrofobiche a minimizzare l'interazione con l'acqua, mentre l'effetto della concentrazione sarebbe dovuto alla diversa densità di sostanza disciolta. Dalla risultante di queste forze in gioco dipenderebbe una espansione o una contrazione delle HS fino a minimizzare l'energia del sistema.

Questo modello è stato sviluppato su misure di tensione superficiale e viscosità delle soluzioni, e elaborato attraverso le equazioni di Flory e Fox (Flory e Fox, 1951) che sono valide per sostanze dalla natura polimerica già conosciute. Tali conclusioni risultano quindi piuttosto speculative, e l'emergere di nuove ipotesi strutturali ben più compatibili con i dati sperimentali spingono ormai ad abbandonare questa concezione.

Riprendendo l'azione surfattante delle HS, un modello di tipo micellare è stato formulato da Wershaw (Wershaw, 1986). Secondo questa teoria le HS sarebbero strutture oligomeriche

anfifiliche con conformazione micellare altamente organizzate, con la parte idrofila rivolta all'esterno a interfacciarsi con i minerali del suolo o l'acqua di idratazione, e le catene idrofobiche a formare un microambiente apolare in cui altre sostanze idrofobiche potrebbero ripartirsi per minimizzare il contatto con l'acqua. Le interazioni implicate quindi sarebbero principalmente legami idrogeno, interazioni di van der Waals ed idrofobiche.

L'ipotesi avanzata in seguito da Engebretson e von Wandruszka (Engebretson & von Wandruszka, 1994), riprende l'idea micellare postulando ulteriormente la presenza di porzioni polari dovute al mescolamento di molecole idrofiliche all'interno della fase apolare, con molecole d'acqua a fungere da raccordo tra funzioni ionizzate, accanto alle già citate interazioni deboli. Tale idea supera il limite dell'eccessiva organizzazione del modello di Wershaw. Tuttavia, entrambe queste teorie attribuiscono dei pesi molecolari piuttosto importanti alle strutture oligomeriche.

Sulla base di alcune osservazioni sulla tendenza degli HA a eluire al di fuori di membrane dializzanti in presenza di acido acetico, si è dubitato dell'effettivo peso molecolare dei supposti macropolimeri umici. La cromatografia ad esclusione molecolare è stata impiegata al fine di studiare la distribuzione di pesi molecolari nei materiali umici all'aggiunta di acido acetico. Tale esperimento è stato svolto da Piccolo e collaboratori utilizzando acido acetico nella miscela di eluizione con analizzatore UV e indice di rifrazione (RI) e confrontando il comportamento degli HA con altri standard polimerici acidi come polistirensolfonati (Piccolo *et al.*, 1999; Piccolo *et al.*, 2000; Piccolo *et al.*, 2001). L'effetto si è rivelato essere peculiare al campione umico, dove si è riscontrata un'alterazione dei tempi di ritenzione con l'azione di acidi organici, mentre nulla cambiava per le vere strutture polimeriche degli standard. Le sostanze umiche si dimostravano dunque aggregazioni a PM solo apparentemente grande, e le sue molecole costitutive, con un PM effettivo presumibilmente inferiore ai 1000 Da, erano tenute insieme in associazioni supramolecolari da forze deboli che potevano essere facilmente rotte dall'azione dell'acido acetico.

Il confronto tra i cromatogrammi UV ed RI ha inoltre evidenziato che la separazione reciproca dei cromofori a causa dell'azione combinata dell'acido organico e della dinamica cromatografica, ha prodotto un notevole abbassamento dell'intensità del segnale UV, effetto detto di ipocromismo. Questa implicazione smentisce il modello a gomitolo essendo questa basata sulla contrazione molecolare a pH acidi, in netto contrasto coi dati sperimentali. La capacità della SEC di evidenziare un indebolimento nelle forze che tengono insieme l'architettura delle HS è ascrivibile all'impedimento che incontrano le HS liberate nella soluzione, e entrate nei micropori della fase stazionaria SEC, a ristabilire il contatto con l'aggregato primigenio, fenomeno evidentemente impossibile in tecniche discontinue come dialisi o ultracentrifugazione (Piccolo, 2001; Piccolo *et al.*, 2001, Piccolo, 2002).

A seguito di questi risultati incoraggianti, altri sforzi sono stati esercitati per studiare il comportamento degli HA e più in generale le HS con gli acidi organici. L'introduzione della più efficiente high performance SEC (HP-SEC) (Piccolo *et al.*, 2000) ha permesso l'automazione delle analisi e il recupero massimale degli analiti, con un sensibile accorciamento dei tempi di analisi. E' emerso infatti che anche altri tipi di acidi, in particolare dioici e sulfonici, con caratteristiche simili all'acido acetico, possono indurre l'apertura dell'architettura supramolecolare, a patto che essi abbiano un adeguato bilanciamento tra apolarità e polarità, e che le dimensioni molecolari non siano eccessive da impedirne la penetrazione.

Questa teoria supramolecolare è stata confermata indirettamente anche da esperimenti basati su altre caratteristiche chimico fisiche della sostanza organica, come NMR multidimensionale (Simpson, 2002) e diffusionale (Smejkalova and Piccolo, 2008), e spettrometria ESI-MS (Pfeifer *et al.* 2000, Piccolo e Spiteller 2003, Stenson *et al.* 2003) ed è ormai accettata come punto di partenza ottimale per la delucidazione dell'architettura molecolare delle HS.

## 1.5 Le basi per una scienza umeomica

L'identificazione dei componenti principali all'interno di un insieme altamente popolato passa attraverso una catalogazione rigorosa previa separazione dei singoli elementi. Questo approccio è stato reso popolare dai metodi di analisi degli acidi nucleici e delle proteine di interi genomi, trascrittomi e proteomi di organismi viventi. In questo esempio però è evidente come l'omogeneità dei geni, degli mRNA e delle proteine come proprietà chimico fisiche ne semplifica l'analisi. Con un'unica tecnica di blotting (ovvero separazione e identificazione delle singole componenti con un unico procedimento) adattata alle caratteristiche delle biomacromolecole si ottiene un'unica risposta nella forma di una mappatura. Questo approccio analitico non è di semplice applicazione alle HS, per via del fatto che una tecnica in grado di analizzare in un'unica istanza la moltitudine di composti dalle proprietà chimico fisiche molto diverse non è a nostra disposizione. Un elemento che contribuisce ad innalzare ulteriormente la difficoltà di questo obiettivo è l'interazione reciproca delle molecole nella loro struttura supramolecolare, che influenza la reattività introducendo numerose variabili fuori controllo come una sorta di “principio di indeterminazione” dell'*humus*, e ne inficia la esatta risposta strumentale. Per effetto di queste valutazioni l'analisi delle componenti principali delle HS deve essere condotta dopo un'adeguata omogeneizzazione del campione attraverso il frazionamento, la purificazione e la ricerca di condizioni di analisi più efficaci a seconda delle esigenze.

I primi metodi di analisi della composizione chimica delle sostanze umiche prevedevano la degradazione chimica ossidativa o riduttiva con condizioni di reazione piuttosto drastiche e l'impiego di reagenti altamente aggressivi quali ossidi di manganese e rame, peracidi organici, ossiacidi del cloro o amalgama di sodio. Questo approccio da un lato supera il limite della autoaggregazione delle sostanze, essendo la struttura supramolecolare scardinata dalla scissione di legami covalenti C-C, ma rimane comunque una tecnica distruttiva, e pertanto in grado di produrre artefatti e di evidenziare strutture ormai lontane dalla loro chimica originaria e difficilmente ad essa



ric conducibili. Le più attuali tecniche di analisi elementare e di pirolisi accoppiata a spettrometria di massa possono essere associate a questa categoria.

Altre forme di degradazione chimica previa scissione dei più labili legami esterei si sono affermate per la loro scarsa tendenza a formare artefatti. Essi hanno il vantaggio di agire su un tipo di legame particolarmente abbondante nelle HS, e più in generale nelle forme viventi. Il materiale umificato, porta un contributo di complessità macromolecolare ereditato dalla non completa decomposizione di biomolecole tra cui lignine, cutine e suberine, in cui il legame tra un acido e un alcol è altamente rappresentato, e, venuto a mancare questo elemento di stabilità, viene intaccata parzialmente la struttura supramolecolare, risultando in un substrato più semplice e idoneo all'analisi.

La scissione del legame estereo può avvenire in ambiente acquoso (idrolisi) o alcolico (solvolisi) per catalisi acida o scissione basica, nel secondo caso la reazione è stechiometrica e irreversibile. Da catalizzatore acido può anche fungere un acido di Lewis.

Un discorso analogo vale per i più resistenti legami eteri, importanti soprattutto nelle lignine e nei polisaccaridi a lunga catena. La rimozione selettiva di queste funzioni avviene solo in ambiente acido acquoso in presenza di ottimi nucleofili in grado di scalzare i pessimi gruppi uscenti alcolici a temperature piuttosto alte. La scissione dei legami eteri non può avvenire selettivamente in presenza di legami esterei. Queste considerazioni hanno suggerito una strategia a *step* successivi di scissione di legami deboli, seguendo un ordine di reattività. Sono stati compiuti sforzi per adattare questo approccio alle HS (Almendros *et al.*, 1998; Grasset e Amblès, 1998b). Recenti studi di confronto tra metodi analitici (Baiano, 2006) ha evidenziato che le rese analitiche di tutte le molecole di un campione di HA calcolate cumulativamente sono maggiori su tutti i componenti rispetto al totale, per effetto della ridotta eterogeneità.

Seguendo lo schema sintetico standardizzato, sono attaccate dapprima le funzioni esteree più suscettibili alla reazione perché meno ingombrate, successivamente si agisce sulle funzioni esteree

più ingombrate con un nucleofilo più aggressivo, e infine si idrolizza in acido il forte legame etero. Questi passaggi hanno anche l'effetto di liberare molte funzioni ossidriliche mascherate sotto forma di metossili così da generare un materiale più idrofilo. Questo ciclo di reazioni, preceduto da un'estrazione solido-liquido con solventi organici volta a rimuovere sostanze già inizialmente non legate chimicamente alla matrice umica, è stato accoppiato all'analisi dei prodotti di frazionamento con metodi tradizionali di MS e NMR che ben si adattano a sostanze organosolubili. Tuttavia quella porzione di materiale che costituisce il residuo inerte al procedimento ha una solubilità limitata ed è di difficile caratterizzazione molecolare senza ricorrere a obsolete tecniche distruttive. L'analisi strumentale della struttura molecolare delle componenti di questo materiale, insieme ai prodotti di estrazione idrosolubili andrebbero a integrare il quadro del materiale organosolubile.

L'applicazione di tecniche di estrazione e analisi strumentale sempre più avanzate porterà in ultima istanza alla completa definizione delle componenti di tutti i campioni di HS. Questa mappatura sarà di enorme utilità nella definizione dell'architettura e dell'origine delle HS e consentirà di mettere in correlazione le proprietà pedologiche di un suolo con il suo "umeoma".

## **CAPITOLO 2**

### **DISEGNO SPERIMENTALE E OBBIETTIVI DELLA TESI**

La genesi, la composizione e l'architettura molecolare delle HS sono argomento di studio e di ricerca per l'importanza che hanno nell'ecosistema. La genesi delle sostanze umiche ne determina la composizione, la quale a sua volta è responsabile della loro conformazione. Le difficoltà che si accompagnano all'analisi delle HS sono direttamente correlate alla mancanza di una tecnica di analisi conosciuta apposta per questo tipo di matrice la cui eterogeneità rende i metodi tradizionali inaffidabili a causa delle interferenze che si vengono a generare tra le sostanze in analisi. Affinché siano efficacemente delucidate le strutture delle HS è necessario, in mancanza di una tecnica strumentale idonea per lo studio delle aggregazioni supramolecolari, definire una strategia per adattare le tecniche all'analisi di sostanze che per molti aspetti si discostano dalle consuetudini della chimica analitica.

Metodi di microscopia elettronica e a forza atomica, seppur in grado di saggiare la struttura tridimensionale delle HS, non hanno la risoluzione necessaria per dirimere la controversa architettura molecolare delle HS. L'impiego dei metodi più avanzati di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), in particolare gli esperimenti in fase solida Cross Polarization Magic Angle Spinning (CP-MAS) e di omo- ed etero-correlazione bidimensionali, e delle migliori innovazioni nel campo delle sorgenti e dei rivelatori in Spettrometria di Massa (MS), possono aprire nuovi orizzonti per la definizione della struttura delle HS. Questi metodi devono essere ottimizzati tenendo conto della natura supramolecolare degli analiti, molecole a peso molecolare relativamente basso ma formanti aggregazioni spontanee. (Piccolo, 2001).

L'obiettivo di questa tesi consiste nello sviluppo di un nuovo approccio all'analisi di un HA di un suolo. Nel disegno sperimentale occupa un ruolo cardine la raffinazione delle singole componenti attraverso la ripartizione in frazioni sempre più omogenee. Infatti, in base a

osservazioni recenti sull'analisi di HA, l'analisi di una componente sul materiale tal quale genera sempre risultati quantitativamente inferiori rispetto alla stessa analisi condotta su una frazione più omogenea (Baiano, 2006). Tale fenomeno è ascrivibile alle interferenze provocate dalla eterogeneità della matrice e da fenomeni di aggregazione che ostacolano la rivelabilità delle sostanze. La ripartizione dell'HA in sottofrazioni quindi risponde a questa particolare esigenza analitica. Il procedimento utilizzato descritto nella sezione Materiali e Metodi procede a stadi ed estrae sottofrazioni da un residuo che va depauperandosi di componenti più reattive, diventando sempre più refrattario. Questo procedimento genera, in virtù dei numerosi passaggi che comporta, una moltiplicazione del numero di sottofrazioni, con il vantaggio di un aumento dell'omogeneità e della rivelabilità delle componenti principali in analisi. Ogni frazione ottenuta è sottoposta a metodi chimico-fisici di analisi strumentale, generando così una moltitudine di informazioni caratterizzanti la materia organica. Queste informazioni sono acquisite sotto forma di spettri di risonanza magnetica nucleare (NMR) o spettrometria di massa (MS) e dall'elaborazione di questi si ottengono preziose informazioni sulle strutture delle singole molecole presenti nell'HA. La separazione in sottofrazioni dell'HA ha quindi da un lato il compito di permettere la caratterizzazione del materiale, dall'altro permette di classificare le sue componenti principali in base alla polarità e al modo in cui esse sono legate al resto della matrice.

Particolare interesse desta la caratterizzazione del residuo prodotto al termine del frazionamento, di cui le informazioni sono scarse a causa della sua inerzia chimica e della scarsa solubilità. Queste caratteristiche rendono infatti questo materiale analizzabile o allo stato solido, o usando tecniche pirolitiche distruttive i cui risultati sono ai fini della caratterizzazione di difficile interpretazione, oppure in soluzione acquosa alcalina o un altro solvente molto polare. A tal proposito sembrano adattarsi alle caratteristiche di tale residuo le metodiche di NMR in soluzione bidimensionale e di MS (con strumento ad alta risoluzione e dotato di modalità tandem) accoppiate a cromatografia liquida (LC). In quest'ultima applicazione, l'obiettivo auspicabile è scomporre fino ai minimi

termini l'aggregazione unica rivelando la formula bruta e la struttura delle specie chimiche che ne fanno parte.

Anche le varie sottofrazioni di estrazione idrosolubili sono state caratterizzate con le medesime tecniche già menzionate, mentre le organo solubili sono state soggette a caratterizzazione per via GC-MS. Quest'ultima è documentata in letteratura per lo studio delle frazioni lipidiche di HS (Grasset e Amblès, 1998b) e il suo stato di sviluppo è più avanzato rispetto all'equivalente LC. Tuttavia, ci sono elementi che possono essere valutati volti all'ottimizzazione del processo di preparazione del campione all'analisi, sia nella scelta dei reagenti che delle condizioni di reazione, e nella sperimentazione di una fase stazionaria per la Solid Phase Extraction diversa dalla più consueta aminopropilica (Gutierrez *et al.*, 1998).

Le complesse informazioni prodotte con la tecnica MS sono poi integrate dall'analisi degli stessi campioni, ove possibile, sotto il profilo NMR in soluzione, valutando eventuali analogie o discrepanze.

Una delle applicazioni più proficue della MS è la possibilità di confrontare gli integrali delle aree dei segnali con quelli di sostanze standard a concentrazioni note opportunamente preparate. Questo risvolto dell'analisi completa il disegno sperimentale con dati quantitativi. Questo approccio analitico è valido tanto per le tecniche GC-MS (con standard volatili) quanto LC-MS (con standard ionizzabili). Questo approccio analitico, applicato all'analisi degli HA è uno sforzo verso la mappatura “*umeomica*” delle HS. Naturalmente, questo approccio può ampliarsi anche agli FA e alla HU, non presi in considerazione nel presente studio.

Infine, informazioni sullo stato conformazionale che accompagna queste identità molecolari sono ricavate da alcune applicazioni avanzate di CPMAS-NMR (Variable Spin-Lock) e L-NMR DOSY (Diffusion Order SpectroscopY) che attribuiscono ai vari segnali corrispondenti alle diverse categorie di molecole dei parametri, come il tempo di rilassamento spin-lattice nel reticolo,  $T_{1\rho}(H)$ ,

e il coefficiente di diffusione,  $\log D$ , riconducibili rispettivamente alla rigidità dell'architettura molecolare e al volume idrodinamico degli aggregati in soluzione.

Nell'ambito degli studi conformazionali sugli HA con le tecniche NMR menzionate, è stato studiato l'effetto del legame di un HA con specie cationiche abbondanti nel suolo,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , a varie concentrazioni. A tal fine è stato utilizzato un HA da Lignite (*brown coal*) particolarmente adatto per la facilità con cui è purificato da contaminanti inorganici.

Questa nuova strategia analitica apre nuovi orizzonti nella definizione di un nuovo modello molecolare, posto che esso sia in accordo con le basi sperimentali, con il risvolto prospettico dell'applicazione di software di modeling molecolare idonei allo studio delle HS.

## CAPITOLO 3

### MATERIALI E METODI

#### 3.1 Estrazione e purificazione di acidi umici

I due acidi umici (HA) utilizzati in questa tesi sono stati isolati con metodi standard (Stevenson, 1994). Il primo, HA-Vico, oggetto dei procedimenti estrattivi, è stato isolato da un suolo campionato nella caldera vulcanica del lago di Vico, nei pressi di Roma (Italia), e classificato come Allic Fulvudand. Il secondo, HA-LIG, usato in esperimenti di complessazione con metalli, è stato isolato da un campione di Lignite di origine fossile (brown coal) del Nord Dakota (Mammoth Chem Co.).

Per l'estrazione di HA-Vico, 200 g di suolo seccato all'aria e vagliato a 2 mm sono stati sospesi, in rapporto p/v pari a 1:5, in 500 ml di una soluzione 0.5M di NaOH (Aldrich, Grado R) e 0.1M di  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (Aldrich, Grado R). Dopo 12 h di agitazione in atmosfera inerte di  $\text{N}_2$ , la miscela di estrazione è sottoposta a centrifugazione a 4000 rpm per 20 minuti e successiva allontanamento del surnatante dal residuo- per sifonatura e successiva filtrazione su lana di vetro. La soluzione alcalina ottenuta è stata acidificata con HCl 37% p/v (Carlo Erba, Grado R) fino al pH 1, come rivelato da cartina indicatrice al tornasole. L'HA-LIG è stato ottenuto in maniera simile.

Gli HA precipitati a pH 1 sono stati purificati dai residui inorganici dalle tracce di acidi fulvici (FA), mediante tre cicli di dissoluzione e riprecipitazione con NaOH e HCl, rispettivamente. Quindi, gli HA sono stati dibattuti per 36h in una soluzione acquosa 0.5% p/v in HF (Carlo Erba, Grado R) e 0.5% p/v in HCl, per distruggere residui minerali coestratti, ed il residuo umico finale dializzato in acqua deionizzata in tubi Spectrapore 3 (cut-off di 3500 Da) fino a conduttività  $< 2 \mu\text{S}$ , e successivamente liofilizzato.

### 3.2 Procedura di frazionamento analitico

#### 3.2.1 Estrazione della componente organosolubile non legata covalentemente alla matrice

Il campione di HA-Vico, chiamato **RES0**, è stato, sospeso in una miscela 2:1 di diclorometano (DCM, Carlo Erba, per analisi) e metanolo (MeOH, Carlo Erba, per analisi), in rapporto di 0.5 ml di estraente per ogni mg di campione. La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 24 ore, e quindi centrifugata a 15000 rpm in tubi di teflon per 15 minuti. Il surnatante è stato rimosso e filtrato su filtri circolari in quarzo Watman GF/C (1 micron). Il procedimento di estrazione è stato ripetuto tre volte per garantire un'estrazione esaustiva. La frazione organica, chiamata **ORG1**, è rotante stata rotoevaporata ed essiccata sotto vuoto. Il residuo solido, chiamato **RES1**, è stato essiccato prima all'aria e poi sotto vuoto.

#### 3.2.2 Estrazione della componente legata alla matrice con legame estere labile

Il campione di HA residuo dalla prima estrazione, **RES1**, è stato posto in tubo di teflon e aggiunto con una soluzione al 12% v/v di trifluoruro di boro ( $\text{BF}_3$ , Sigma, soluzione in MeOH al 14%) in metanolo, in rapporto 0.075 ml per mg di sostanza. Il tubo sigillato è stato tenuto in stufa per 12h a 90°C, quindi raffreddato e centrifugato a 15000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato mescolato con un volume uguale di acqua, sufficiente a idrolizzare il  $\text{BF}_3$ , e la soluzione così ottenuta è stata estratta per tre volte con un volume uguale di cloroformio ( $\text{CHCl}_3$ ). Le fasi cloroformiche, più dense, convogliate sono state riunite in una beuta, anidificate con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro (Carlo Erba, Grado R), e poi filtrate su carta, per allontanare il sale, e quindi portate a secco con evaporotazione e sotto vuoto. Questa frazione è stata chiamata **ORG2**.

La fase acquosa, è stata purificata dal materiale inorganico per ultrafiltrazione su membrane Amicon di tipo C (cut-off 1000 Da), finchè il filtrato di lavaggio non ha presentato conduttività < 2  $\mu\text{S}$ , e quindi liofilizzata. Il filtrato raccolto non ha evidenziato tracce significative di materiale organico. Questo materiale è chiamato **ACQ2**. Questa procedura estrattiva è stata ripetuta per 3 cicli



sullo stesso residuo RS1. Al termine del ciclo di reazioni, il residuo è stato dializzato e liofilizzato come descritto in precedenza, e chiamato **RES2**.

### *3.2.3 Estrazione della componente legata alla matrice con legame estere forte*

La reazione di lisi del legame estere più ingombrato richiede un forte nucleofilo come l'idrossido. Il materiale **RES2** è stato sospeso in una soluzione 1M di KOH (Clean Consult, Grado R) in MeOH, in proporzione 0.25 ml per ogni mg di sostanza, in un pallone per reazione di dimensioni adeguate, con l'accortezza di fluxare via l'aria in corrente di azoto e chiudere il sistema con tappo di teflon, onde evitare la fusione di parti di vetro e la conseguente difficile riapertura. Il sistema è stato riscaldato a 70°C per 2h con agitazione magnetica. Dopo il raffreddamento, la soluzione è stata centrifugata a 5000 rpm per 15 minuti in tubo di teflon. Il surnatante è stato raccolto in una beuta di vetro, mentre il residuo è stato sottoposto a cicli di lavaggio in agitazione meccanica e poi centrifugazione, per due volte con MeOH e due con DCM, usando volumi comparabili al volume iniziale di reazione. I lavaggi sono stati riuniti al surnatante. Il surnatante è stato miscelato con un ugual volume di acqua, acidificato a pH 2 con HCl 37%, ed estratto con ugual volume di CHCl<sub>3</sub> (Carlo Erba, per analisi) per tre volte. L'estratto cloroformico è stato anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, e filtrato su carta, per allontanare il sale, e rotoevaporato. Il così residuo risultante, un liquido viscoso, è stato essiccato sotto vuoto e chiamato **ORG3**.

La fase acquosa, è stata desalinizzata per ultrafiltrazione su membrane Amicon di tipo C (cut off 1000 dalton), come già descritto, e non ha evidenziato quantità apprezzabili di sostanza organica.

Il risultante residuo unico, chiamato **RES3**, è stato dializzato e liofilizzato..

#### 3.2.4 Estrazione della componente legata alla matrice con legame etere

Il residuo ottenuto dopo le reazioni di solvolisi dei legami esteri (**RES3**) è stato quindi sospeso in una soluzione acquosa di HI al 47% p/v stabilizzato con  $\text{H}_3\text{PO}_2$  (Fluka) in proporzione 0.25 ml per mg di sostanza, in un pallone da reazione in atmosfera di azoto. La miscela è stata riscaldata a  $75^\circ\text{C}$  per 48h. Al termine della reazione, il prodotto grezzo è stato lasciato raffreddare e trasferito in un becker, il pH neutralizzato per aggiunta di  $\text{NaHCO}_3$  (Carlo Erba, Grado R) da soluzione satura e l'eventuale  $\text{I}_2$  formatosi durante la reazione è stato ridotto con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Carlo Erba, Grado R) fino a decolorazione del surnatante. Il miscuglio è stato poi centrifugato a 5000 rpm per 15 minuti e il residuo, chiamato **RES4**, dializzato e liofilizzato.

I passaggi di frazionamento sono schematizzati in **Figura 4.1**.

#### 3.3 Solid Phase Extraction (SPE) delle frazioni organiche **ORG1**, **ORG2**, e **ORG3**

Si preparano 500  $\mu\text{L}$  di una soluzione di sostanza organica in cloroformio (per analisi) 10 mg/ml, nel caso di **ORG1** e **ORG2** è possibile operare gravimetricamente, mentre nel caso di **ORG3** si procede volumetricamente, essendo un liquido ad alta viscosità. Si carica questa soluzione su una colonna di SPE di silice (Phenomenex Strata  $\text{SiO}_2$  500 mg, 3ml) precedentemente ambientata con cloroformio. Si eluisce con 5.0 ml di cloroformio e si raccoglie una prima frazione meno polare, successivamente si eluisce con una miscela 1:3  $\text{CHCl}_3$ :MeOH fino a decolorazione della colonna (normalmente 5.0 ml), e si raccoglie una seconda frazione più polare. Le frazioni sono evaporate in un pallone a rotavapor.

#### 3.4 Separazione in cromatografia preparativa a esclusione molecolare ad alta prestazione (HPSEC) di residuo finale di frazionamento chimico (**RES4**)

Il campione unico solido **RES4**, prodotto finale del frazionamento estensivo, viene disciolto titolandolo a pH 7.20 con una soluzione di NaOH 0.50M con un titolatore automatico (VIT 909

Videotitrator, Radiometer, Copenhagen) per una concentrazione finale di 0.20 g/L fino a che il valore di acidità misurato non risulti costante per almeno 2 ore. Al campione vengono aggiunti 0.3 mg/ml di  $\text{NaN}_3$  microrganismi come batteriostatico. Il campione è successivamente filtrato su microfibra di vetro porosità  $1\mu\text{m}$  (Whatman GF/C) e conservato in frigo in atmosfera di azoto.

Per la cromatografia HPSEC preparativa è stata impiegata una colonna Biosep SEC-S-2000 (300 mm di lunghezza e 21.2 mm di diametro interno) preceduta da una precolonna Biosep SEC-S-2000 (78 mm di lunghezza per 21.2 mm di diametro interno), entrambe commercializzate dalla Phenomenex. Il sistema HPSEC comprende una pompa Gilson modello 305 equipaggiata con un autocampionatore Gilson modello 231 munito di loop da 5.0 mL, un collettore di frazioni automatico modello FC205 e un rivelatore UV Gilson modello 116, impostato sulla lunghezza d'onda di 280 nm. Per la gestione delle corse e la registrazione dei cromatogrammi è stato impiegato il software Gilson Unipoint. La fase mobile impiegata per la separazione è composta da acqua deionizzata 0.3 g/L in  $\text{NaN}_3$  (Sigma, Grado Reagente), 0.10 M in  $\text{AcONa}$  (Sigma, Grado Reagente), e 0.0035 M in tampone  $\text{NaH}_2\text{PO}_3/\text{Na}_2\text{HPO}_3$  (Carlo Erba, Grado Reagente) per un pH compreso tra 7.0 e 7.1 misurato con pHmetro VIT 909 (Radiometer, Copenhagen), ad un flusso di 1.5 ml/min.

L'autocampionatore è stato caricato con flaconi da 20 ml contenenti 16 ml di soluzione preparata come descritto ed ogni flacone è stato campionato automaticamente per 3 iniezioni successive, mentre il collettore di frazioni è stato impostato per raccogliere 9 frazioni di 5 minuti ciascuna e un'ultima frazione a fine corsa da 15 minuti. Il materiale inizia ad eluire dopo 25 minuti. Le dieci frazioni così raccolte sono acidificate a pH 2 con HCl 37% e il precipitato lasciato sedimentare. La soluzione surnatante è decantata e rimossa, mentre il residuo è dializzato con membrane Spectrapore 3 (cut-off 3500 Da), e liofilizzato.

### 3.5 Analisi elementare

L'analisi elementare di alcuni dei campioni studiati nell'ambito del progetto di tesi è stata condotta con un analizzatore Interscience EA 1108 CHNS della Fisons Instruments. Pochi milligrammi di campione secco sono stati pesati in una piccola capsula di stagno e mineralizzato sotto un flusso d'ossigeno a 1020° C. CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NO<sub>2</sub> si sviluppano dal materiale organico, il flusso di gas attraversa un apparato riducente impaccato con Rame metallico che riduce l'ossido nitroso ad azoto molecolare (N<sub>2</sub>). Una colonna gascromatografica separa i componenti e un analizzatore a conduttività termica rileva i picchi corrispondenti ai gas separati. La determinazione quantitativa è condotta per confronto delle aree di integrazione di questi picchi con uno standard esterno come l'acetanilide. L'analisi è condotta in triplicato. La determinazione dell'ossigeno è fatta per differenza sul peso totale, e, pertanto, può essere sovrastimata dalla presenza di ceneri o altri elementi come zolfo e fosforo.

### 3.6 Preparazione di un campione di HA da Lignite puro da metalli e complessazione con quantità note di ioni alluminio e calcio

#### 3.6.1 Purificazione del campione da metalli

Il campione di HA da Lignite (HA-LIG) viene sospeso in acqua deionizzata in rapporto di circa 1 ml per mg di sostanza e titolato a titolatore automatico (VIT 909, Radiometer, Copenhagen) a pH 7.0 con NaOH sotto agitazione magnetica e flusso di azoto, fino a mantenere un valore costante per 2 ore. La soluzione così ottenuta è ulteriormente diluita 1:6 con acqua deionizzata e caricata su una colonna impaccata con resina a scambio cationico (Dowex<sup>®</sup>, 50WX2-400) precedentemente ambientata con NaOH 0.1M e HCl 0.1M e lavata con acqua deionizzata fino a reazione neutra. E' stato utilizzato 1.0g di resina per 30mg di HA di partenza. Un'aliquota della soluzione unica passata attraverso la resina è stata prelevata ed il contenuto di ceneri, per incenerimento in muffola, è risultato < 1%. Il rimanente della stessa soluzione è stato nuovamente

titolato a pH 5.0 come descritto in precedenza, e liofilizzato. L'umato di sodio così ottenuto è prontamente solubile in acqua.

### *3.6.2 Preparazione delle soluzioni metalliche a concentrazione nota*

Un grammo di alluminio metallico (Merck, Grado R) è stato sciolto in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% (Carlo Erba, Grado R) riscaldando a  $100^\circ\text{C}$  fino a completamento dell'ossidazione. La soluzione ottenuta è filtrata su fibra di quarzo (Whatman GF/C) e diluita a 1.0 L. La concentrazione finale è risultata pari a 0.064 M, da determinazione per assorbimento atomico (Perkin Elmer AAnalyst 700).

La soluzione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  è stata preparata sciogliendo una opportuna quantità di  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in acqua deionizzata fino ad una concentrazione analitica di 0.01M.

### *3.6.3 Formazione dei Complessi metallo-umici*

Aliquote di HA-LIG preparato come sopra sono solubilizzate in rapporto 1.0 mg/ml in una soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Carlo Erba, Grado Reagente) 2.0mM e successivamente complessate con aggiunta, a pH 5, di quantità note delle soluzioni di  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Il pH è stato mantenuto costante a pH 5, neutralizzando l'acidità svolta con aggiunta di NaOH 0.1M con titolatore automatico (VIT 909, Radiometer, Copenhagen). Per entrambi i metalli sono stati formati i complessi saturando 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5% e 1% della quantità di carbossili titolabili con le soluzioni di  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . L'acidità totale carbossilica di HA-LIG era risultata pari a 2,66 meq/grammo. Un'aliquota della soluzione di HA-LIG è rimasta non complessata ed usata come bianco di confronto. Tutti i campioni così ottenuti sono congelati e liofilizzati senza ulteriori trattamenti.

### 3.7 Analisi gascromatografica accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS)

#### 3.7.1 Derivatizzazione dei campioni

Le frazioni organiche **ORG1**, **ORG2** e **ORG3** e le rispettive frazioni polari e apolari ottenute per separazione su cartucce SPE in silice (vedi paragrafo corrispondente) essere sono state derivatizzate prima dell'analisi GC-MS. Ciascun campione (<0.30 mg) viene caricato in una vial per analisi e, se necessario, sottoposto a una corrente di azoto per eliminare solventi residui. Il primo passaggio di derivatizzazione prevede la metilazione delle funzioni carbossiliche per sostituzione nucleofila acilica acido-catalizzata in ambiente alcolico a caldo. Perciò, del cloruro di acetile viene fatto reagire con metanolo per generare HCl *in situ* senza addizione di acqua. Circa 0.50 ml di questa soluzione viene aggiunta alla vial contenente il campione e tenuta, ben tappata, a 70°C per circa 1h in incubatore specifico per vials. L'acido e il solvente vengono poi allontanati in corrente di azoto.

I prodotti metilati sono poi sottoposti a protezione delle funzioni ossidriliche libere con gruppo trimetilsililestere. La reazione è condotta iniettando nella vial 100 µL di reagente sililante (BSTFA - N, N bis[trimetilsilil]trifluoracetamide con 1% trimetilclorosilano, Suprachrom s.r.l.) a 70°C per 1 ora. La miscela di reazione viene poi portata a un volume finale di 500 µL con diclorometano. In alternativa, la reazione può essere condotta in presenza di 500 µL di un solvente organico polare anidro come la piridina (Aldrich, Grado Anidro) o con una miscela 98% dimetiformamide (DMF) (Aldrich, Grado Anidro) con 2% di piridina, mantenendo costanti le altre condizioni. In questo caso non è necessario diluire con il diclorometano.

Per la determinazione quantitativa sono state preparate delle miscele di standard forniti da Aldrich opportunamente pesati, metilati e sililati con la stessa sequenza di reazioni applicate ai campioni: acido tridecanoico, acido  $\alpha,\omega$  docosandioico, acido  $\omega$  idrossiesadecanoico, acido paracumarico, e  $\beta$ -sitosterolo. Sulle aree dei segnali rivelati per GC-MS sono state costruite delle curve di calibrazione.

### 3.7.2 Analisi strumentale

La analisi sono state condotte su un gascromatografo PerkinElmer Autosystem XL munito di una colonna capillare di silice fusa Restek RTX®-5MS, 30m x 0.25 µm di spessore ed equipaggiato con spettrometro di massa PerkinElmer Turbomass Gold. La temperatura dell'iniettore è stata settata a 250°C costanti, il flusso di He regolato a 1.6 ml/min con modalità split in rapporto 1:17. La temperatura iniziale del forno è stata programmata in funzione della temperatura di condensazione del solvente impiegato: 100°C per il diclorometano, 115°C per la piridina, 150°C per la dimetilformamide. Successivamente per tutti i solventi, essa è stata portata fino a 300°C con incremento di 4°C/min, e tenuta costante per 20 minuti. Lo spettro di massa è stato acquisito in modalità a scansione completa nell'intervallo 50-600 m/z con un'energia di ionizzazione ad impatto elettronico di 70 eV. L'identificazione dei composti è stata effettuata confrontando lo spettro di massa di ciascun picco cromatografico con quanto riportato della libreria informatica per MS del NIST (National Institute for Standards and Technology) in *bundle* con il software Turbomass.

## 3.8 Analisi ESI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry) in iniezione diretta e accoppiata a HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) analitica

### 3.8.1 Preparazione dei campioni

Il campione di HA o la sua sottofrazione è pesato e trasferito in una vial da analisi per LC ed è disciolto in un volume di soluzione acquosa di ammoniaca 0.01M per una concentrazione finale di 0.40 g/L. La vial è successivamente sottoposta a centrifugazione per evitare iniezione di particelle grossolane nello strumento.

Le soluzioni di standard deuterati per l'analisi quantitativa (Cambridge Isotope Labs, 99%) sono state preparate in ammoniaca acquosa 0.01 M con acido esadecanoico (16-d-3) e acido 4-idrossibenzoico (*ring*-<sup>13</sup>C-6) in un intervallo di concentrazioni utili ad una curva di taratura valida

tra 10 ng/ml e 10 µg/ml. Come standard interni sono stati inoculando usate le soluzioni di standard aggiunte ai campioni da studiare, raggiungere fino ad una concentrazione di 1 µg/ml.

### *3.8.2 Cromatografia liquida HPSEC*

I campioni sottoposti ad analisi in tecnica ifenata LC-MS sono stati iniettati, con iniettore Rheodyne equipaggiato con un loop da 50 µ, in una colonna Phenomenex Bio-Sep SEC-S 2000 a granulometria di 5 micron, dimensioni 300 x 7.8 mm termostatata a 30°C munita di precolonna Phenomenex Bio-Sep SEC-S 2000 a granulometria di 5 micron, dimensioni 30 x 7.8 mm. La pompa per HPLC (Dionex P-580) ha garantito un'eluizione isocratica (0.3 ml/min) con una miscela di A:B 55:45, con A: tampone acetato di ammonio (Sigma, Grado Reagente) e 5% acetonitrile (Merck, per HPLC) in acqua deionizzata, e B: acetonitrile. Il tempo di corsa è stato di 70 minuti. Per le iniezioni dirette è stato usato il medesimo apparato, facendo a meno di colonna e precolonna.

### *3.8.3 Analisi strumentale*

Un apparecchio LTQ Orbitrap ® (Thermo Electron Corporation, MA, USA) è stato usato per le analisi delle soluzioni umiche. Lo strumento può essere settato in modalità LTQ (Trappola ionica lineare) o in modalità combinata LTQ-Orbitrap, in modalità ESI (Electrospray) o APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), ed è in grado di analizzare gli ioni carichi positivamente o negativamente. Nella maggior parte delle analisi condotte, lo strumento è stato usato in modalità ESI-negativa-Orbitrap con un range di massa da 100 a 1000 m/z, e con un tempo di scansione di 1.0 secondo (frequenza di scansione 1Hz), corrispondente ad un potere di risoluzione di massa nominale da 60.000 a 400 m/z. La calibrazione dell'alta risoluzione è stata messa a punto con una miscela di standard fornita dalla casa di costruzione dello strumento. Come “sheath gas” è stato usato azoto (45 unità arbitrarie) e come “collision gas” è stato usato elio (7.99 unità arbitrarie). La maggioranza delle misurazioni è stata operata con sorgente ESI a un voltaggio



di spray di 4.00 kV, e una corrente di spray di 2.05  $\mu$ A. Il capillare è stato impostato a una temperatura di 260°C e un voltaggio di -14.93 V.

Per le misurazioni in tandem MS (MS/MS), lo strumento è stato usato in modalità LTQ con risoluzione pari a 7500 e con sorgente ESI negativo. Per ogni composto è stata programmata una finestra di scan con intervalli a partire da 50 m/z fino alla massa dello ione molecolare. Una corsa è risultata sufficiente per l'analisi tandem di circa 8 molecole. L'energia di collisione è stata settata a 45 unità per MS<sup>2</sup> e 35 per MS<sup>3</sup>. Il tempo per ogni evento di scansione è stato di 30 ms.

### 3.9 Spettroscopia NMR

#### 3.9.1 <sup>13</sup>C-NMR allo stato solido

Gli spettri NMR dei campioni solidi di sostanze umiche sono stati sottoposti a esperimenti con la tecnica CPMAS (Cross Polarization Magic Angle Spinning) e in alcuni casi con applicazioni particolari di questo metodo, definite come VSL (Variable Spin Lock) e Dipolar Dephasing (DD), utilizzando uno strumento Bruker AV300, operante sul <sup>13</sup>C a 75.475 MHz, ed equipaggiato con un probe Wide Bore MAS a 4mm. La velocità di rotazione del rotore è stata settata a 13000 $\pm$ 2 Hz per evitare rilevamento di spinning side bands.

Per gli esperimenti di CP-MAS sono stati acquisiti 1510 punti, con tempo di riciclo di 1 secondo e di acquisizione di 20 ms. E' stata utilizzata la sequenza di impulsi CP con RAMP. Sono state accumulate tipicamente tra le 500 e le 700 scansioni. L'esperimento di Dipolar Dephasing (DD) è stato impostato con un dephasing delay di 15  $\mu$ s e 15000 scansioni

Per gli esperimenti VSL, sono stati acquisiti 1510 punti con tempo di riciclo di 3 secondi e di acquisizione di 30 ms. E' stata utilizzata una sequenza VSL con tempo di contatto di 1 ms congiuntamente alla sequenza RAMP, per un numero di scansioni di 2200. L'intervallo utilizzato per il VSL è variato tra 0.01 e 7.50 ms.

I dati sono stati elaborati con software Mestre-C versione 4.9.9.9. Ai FID (Free Induction Decay) è stata applicata una trasformazione di Fourier con zero filling di 2k e una funzione filtro di tipo esponenziale con LB di 100 Hz e una correzione della linea di base con funzione polinomiale di Bernstein di ordine 2.

Il tempo di rilassamento di “spin-lattice” protonico nel reticolo ( $T_{1\rho}(H)$ ), in assenza di fenomeni di rilassamento ( $I_0$ ), è stato correlato alle aree dei segnali con la seguente relazione matematica (Wilson, 1987):

$$I(t) = I_0 \exp(-t_{SL}/T_{1\rho}(H))$$

dove  $t_{SL}$  sta per variable spin lock time, e  $I_0$  è l'intensità del segnale al *tesimo* tempo di spin lock. I valori di  $T_{1\rho}(H)$ , and  $I_0$  sono stati calcolati con software OriginPro 7.5 SR5 vs. 7.5870 (B870).

### 3.9.2 NMR in soluzione

Gli spettri NMR ad una (1D), doppia (2D) dimensione, e di diffusione (DOSY) sono stati condotti su uno strumento Bruker Avance 400 MHz, operante a frequenze del protone e del carbonio rispettivamente di 400.12 MHz e 100.62 MHz. Il magnete è stato munito di un probe Bruker da 5 mm a *inverse broadband* e *z-gradient coil* schermato attivamente. Gli spettri sono stati acquisiti ed elaborati con software Bruker Topspin 1.3. I campioni sono stati disciolti in tubi da 5 mm di diametro in quarzo. Per gli esperimenti mono e bidimensionali sul bulk e frazioni di HA-VICO, è stata usata una concentrazione variabile in funzione della massima solubilità campione, mentre per gli spettri DOSY, è stata uniformata la concentrazione a 5.0 mg/ml per le frazioni di HA-VICO, e 6.7 mg/ml per i complessi metallo-umici di HA-LIG. Gli spettri sono stati acquisiti in soluzione di  $CD_3OD/CDCl_3$  1:1 per la frazione **ORG1**, DMSO- $d_6$  per le frazioni **ORG2**, **ORG3** e **ACQ2**, mentre per tutti gli altri campioni gli spettri sono stati acquisiti in NaOD 0.1M in  $D_2O$ . , Per i complessi metallo-umici di HA-LIG è stata utilizzata  $D_2O$  come solvente.

Sono stati condotti esperimenti monodimensionali protonici (1D-H-NMR) con soppressione del solvente con presaturazione del segnale. Sono stati determinati i seguenti valori di chemical shift per i solventi: DMSO 3.48 ppm; D<sub>2</sub>O 4.70 ppm. Sono state accumulate 1000 scansioni per gli spettri in DMSO-d<sub>6</sub> e un numero variabile tra 30 e 128 per gli spettri in D<sub>2</sub>O

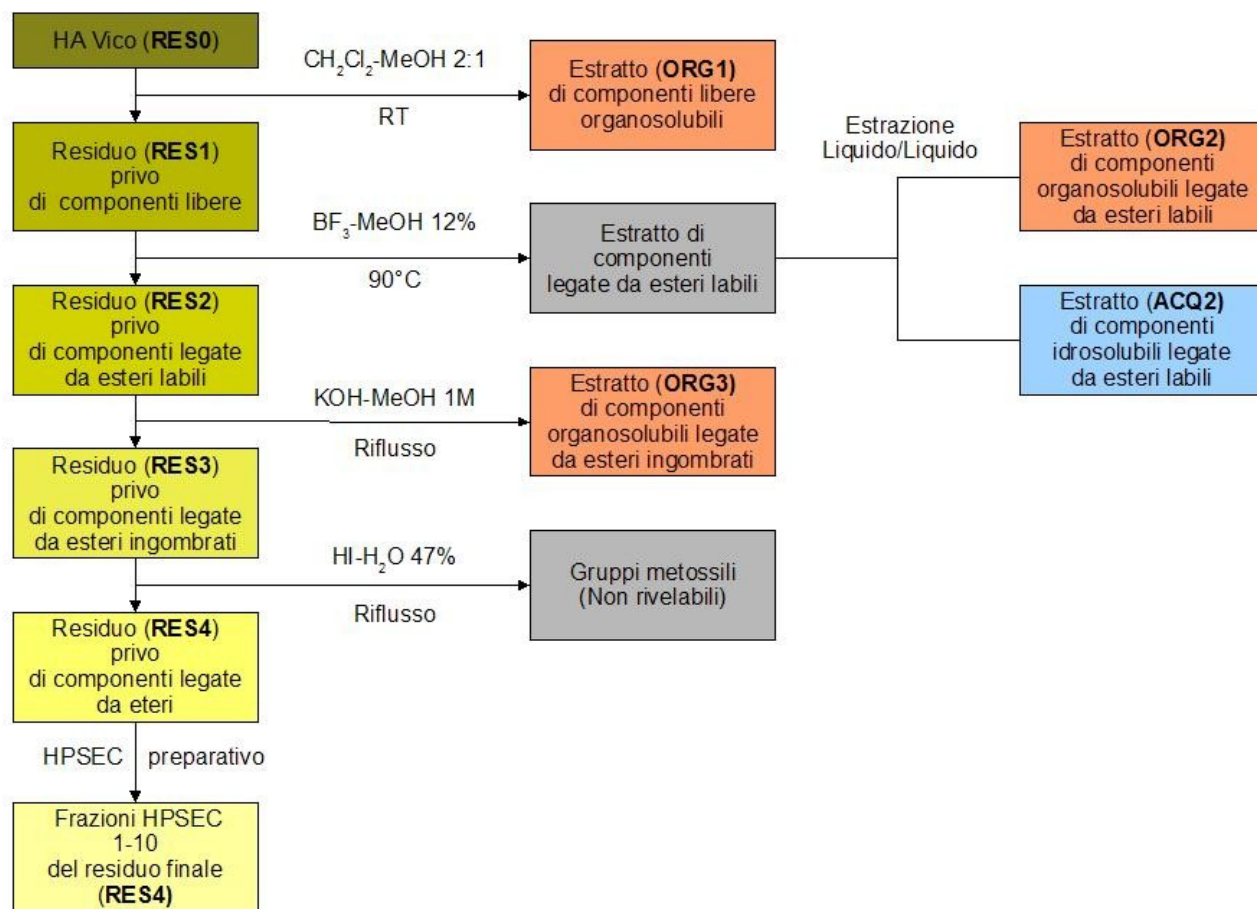
I parametri usati per gli esperimenti bidimensionali di omocorrelazione: MQF-COSY (Multiple Quantum Filter COrrrelation SpectroscopY), TOCSY (Total Correlation SpectroscopY); ed eterocorrelazione: HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) e HMBC (Heterocorrelation Multiple Bond Correlation) sono riassunti nella **Tabella 3.1**. Tutti gli esperimenti sono intesi con soppressione del solvente.

**Tabella 3.1: Prospetto dei parametri utilizzati per gli esperimenti NMR bidimensionali**

Nome	Scansioni (Range)	Data Points (F2/F1)	d1 (Tempo di <i>delay</i> )	Ulteriori informazioni
COSY	60-88	2k/256	2.0 sec	Multiple Quantum Filter, Gradient Pulse
TOCSY	112-128	2k/128	2.0 sec	Phase Sensitive, States-TPPI, mixing time=80 ms
HSQC	128-256	2k/256	2.0 sec	Phase Sensitive, Echo-anti-Echo, TPPI, <sup>1</sup> J H-C=145 Hz
HMBC	100-140	4k/256	2.0 sec	Low pass J filter, Gradient Pulse, <sup>2,3</sup> J H-C=5 Hz

Per la spettroscopia bidimensionale di diffusione (2D-DOSY), è stato utilizzato un gradiente bipolare *pulse field*. Le scansioni (512) sono state accumulate usando un impulso sinusoidale della durata di 2.5 ms con intervallo da 0.674 a 320.030 G/cm in 32 incrementi e un tempo di diffusione tra 120 e 150 ms con un *time domain data points* di 8k. L'apodizzazione è stata fatta moltiplicando i dati per una funzione di esponenziale con LB (Line Broadening) di 0.3 Hz.

**Figura 3.1: Schema del processo di frazionamento**



## CAPITOLO 4

### CARATTERISTICHE E ASPETTI GENERALI DEI CAMPIONI STUDIATI

#### 4.1 Aspetto generale

In questo capitolo sono descritte alcune caratteristiche chimico fisiche dei campioni di HA o delle loro frazioni, da suolo e da lignite, quali solubilità, composizione elementare e rese dei processi estrattivi.

Il materiale di partenza ed i residui dopo ciascuno stadio di estrazione si presentano come solidi di colore molto scuro. Le loro soluzioni risultano opache anche a concentrazioni modeste, e il coefficiente di assorbimento molare del residuo finale risulta essere superiore al materiale di partenza (confrontare cromatogramma HPSEC con rivelatore UV sotto riportato). Ciò è spiegabile sia con una selettiva minore estrazione di gruppi cromofori rispetto alle sostanza a basso indice di insaturazione, sia con un accresciuto coefficiente di estinzione molare della miscela unica residua per più intense interazioni dipolo-dipolo tra i gruppi cromofori (ipercromismo). Inoltre il materiale di partenza ha una consistenza più compatta e vetrosa rispetto ai residui del frazionamento, che appaiono alla vista e al tatto polverulenti e con una spiccata tendenza ad aderire alle superfici. Gli estratti organici si presentano con un colore più tendente al marrone chiaro, più compatti e meno polverulenti dei residui. L'estratto **ORG3**, ovvero il materiale organico più tenacemente legato alla matrice, ha le caratteristiche di un gel molto viscoso, immiscibile con le soluzioni acquose. Tutti le frazioni organosolubili producono soluzioni meno opache (meno cromofori) rispetto al materiale di partenza. Delle frazioni idrosolubili provenienti dall'estrazione liquido/liquido dopo transterificazione acida e basica, solo la prima apprezzabile quantitativamente (**ACQ2**), mentre il materiale derivante dalla seconda è stato ottenuto solo in tracce e fortemente contaminato da sali inorganici, rendendo pertanto impossibile il suo isolamento. La frazione idrosolubile si distingue per il colore marrone chiaro e la tendenza a formare soluzioni di colore giallo chiaro. Inoltre, essa

ha la caratteristica di essere fortemente igroscopica, e di cambiare la sua consistenza da polverulenta a gommosa-collosa (dalla non semplice maneggiabilità) per esposizione all'umidità. La transizione è comunque reversibile, e il fenomeno è evitabile conservando la sostanza in essiccatore.

## 4.2 Solubilità

L'analisi della solubilità delle sostanze in esame rivela che il processo di estrazione delle componenti organiche dalla matrice umica ha prodotto un aumento di solubilità in solventi organici polari aprotici come DMF e DMSO. Per i materiali più lipofili: **ORG1** è più solubile negli alcoli; **ORG2** nei solventi alogenati; **ORG3** non è rappresentato non essendo un solido vero e proprio. L'acqua si rivela, in assenza di alcali, scarsamente adatta a solubilizzare i materiali umici. La presenza di basi, viceversa, è risultata sempre efficace nel solubilizzare il materiale organico, fatta eccezione per **RES2**, per via della metilazione delle funzioni carbossiliche che questo materiale ha subito. La **Tabella 4.1** riassume la solubilità dei vari materiali ottenuti dal processo di frazionamento.

**Tabella 4.1: Solubilità generale di HA da suolo e delle sue frazioni**

Campione	H <sub>2</sub> O	NaOH/ H <sub>2</sub> O	MeOH	CHCl <sub>3</sub>	DMSO	Piridina	DMF
RES0	NO	++	NO	NO	-	NO	-
RES1	NO	++	NO	NO	-	NO	-
RES2	NO	-	NO	NO	+/-	NO	+/-
RES3	NO	+	NO	NO	+	-	+
RES4	NO	+	NO	NO	-	-	+
ORG1	NO	+	++	+/-	++	++	++
ORG2	+	+	+/-	++	++	++	++
ACQ2	NO	++	NO	NO	+	-	+

### Legenda:

**NO:** insolubile; **+**: solubile; **++:** molto solubile; **-:** scarsamente solubile **+/-:** moderatamente solubile;  
**RES0=**Acido umico di partenza; **RES1:** Residuo post estrazione componenti liberi; **RES2:** Residuo post transesterificazione acida; **RES3:** Residuo post transesterificazione alcalina; **RES4:** Residuo finale di frazionamento; **ORG1:** Frazione organica non legata covalentemente; **ORG2** Frazione organica legata con legame estere debole; **ACQ2:** Frazione acquosa legata con legame estere debole

I campioni di HA-LIG eluiti in colonna a scambio cationico sono solubili nella soluzione di eluizione, tuttavia se l'acqua viene allontanata non possono essere ridisciolti senza ausilio di alcali. Questo può costituire un problema per l'analisi in soluzione. Tuttavia, titolando l'eluato a pH 5.0 con NaOH (vedi materiali e metodi), il campione liofilizzato risulta prontamente solubile in acqua.

### 4.3 Analisi elementare

Dall'analisi elementare di alcuni campioni ottenuti dal processo di frazionamento, si evince che l'estrazione di materiale organico con solventi o per reazione chimica ha alterato l'associazione delle componenti molecolari del materiale organico residuo (**RES4**), che presenta delle caratteristiche diverse rispetto al materiale di partenza (**RES0**), tra cui maggiore acidità (come si vede dal rapporto C/O) e insaturazione (come emerge dal confronto del rapporto C/O). Il materiale aromatico in **RES4** risulta pertanto essere più fortemente aggregato. Questo dato è in accordo con l'aumento di assorbanza di **RES4** rispetto a **RES0**. **RES0** risulta anche depauperato del contenuto iniziale di azoto e zolfo. La **Tabella 4.2** riassume i risultati dell'analisi elementare di alcuni dei materiali ottenuti dal frazionamento.

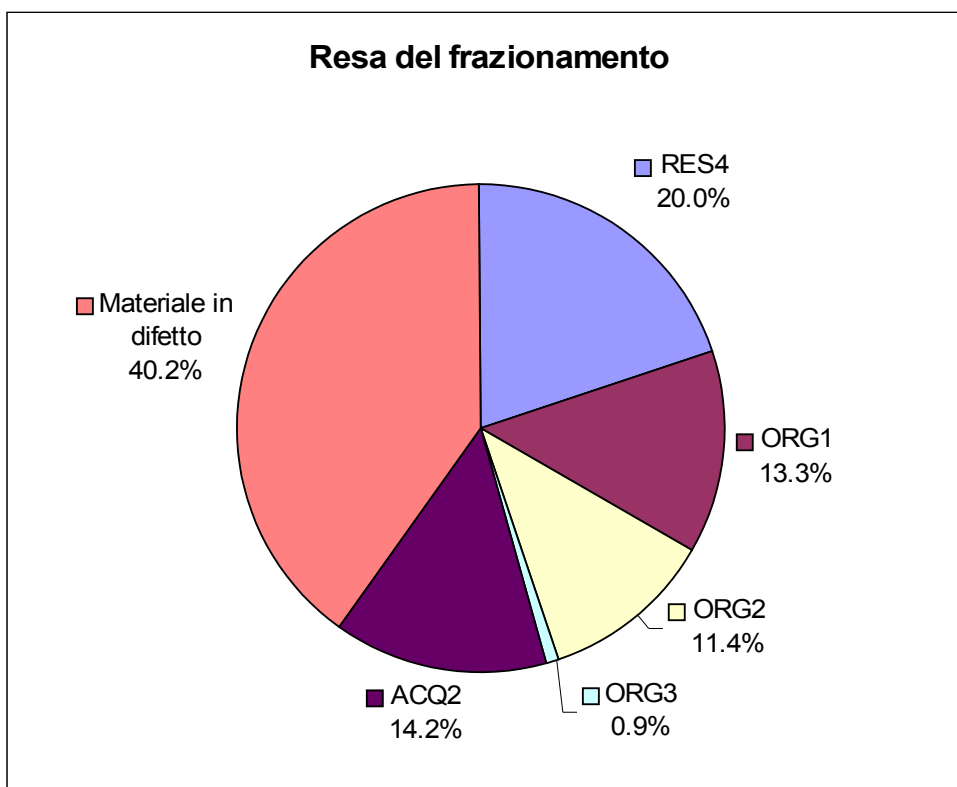
**Tabella 4.2: Analisi elementare di HA-VICO (RES0) e di alcuni intermedi di frazionamento. Valori espressi in % p/p per gli elementi, ed in rapporto stechiometrico per i valori di C/H e C/O. I valori dell'ossigeno sono determinati per differenza.**

Campione	C (%)	O (diff.%)	N (%)	H (%)	S (%)	C/H	C/O
RES0	50.3 (+/- 0.9)	37.3	4.1 (+/-0.1)	4.6 (+/- 0.3)	3.6 (+/- 1.0)	0.91	1.79
ORG1	58.2 (+/- 0.9)	30.2	2.3 (+/-0.1)	6.4 (+/- 0.3)	3.0 (+/- 1.0)	0.75	2.56
RES1	48.5 (+/- 0.9)	39.5	4.3 (+/-0.1)	4.1 (+/- 0.3)	3.6 (+/- 1.0)	0.98	1.63
RES4	42.7 (+/- 0.9)	53.0	1.2 (+/-0.1)	3.0 (+/- 0.3)	0.1 (+/- 1.0)	1.19	1.07

#### 4.4 Rese del processo di frazionamento sequenziale

La **Figura 4.1** riassume i rapporti gravimetrici tra le frazioni e il materiale di partenza (**RES0**)

**Figura 4.1:** Composizione quantitativa del materiale di partenza in funzione delle rese di frazionamento. Il materiale in difetto è attribuibile alla mancata valutazione finale di sostanze volatili o acqua di occlusione persi nei passaggi di purificazione



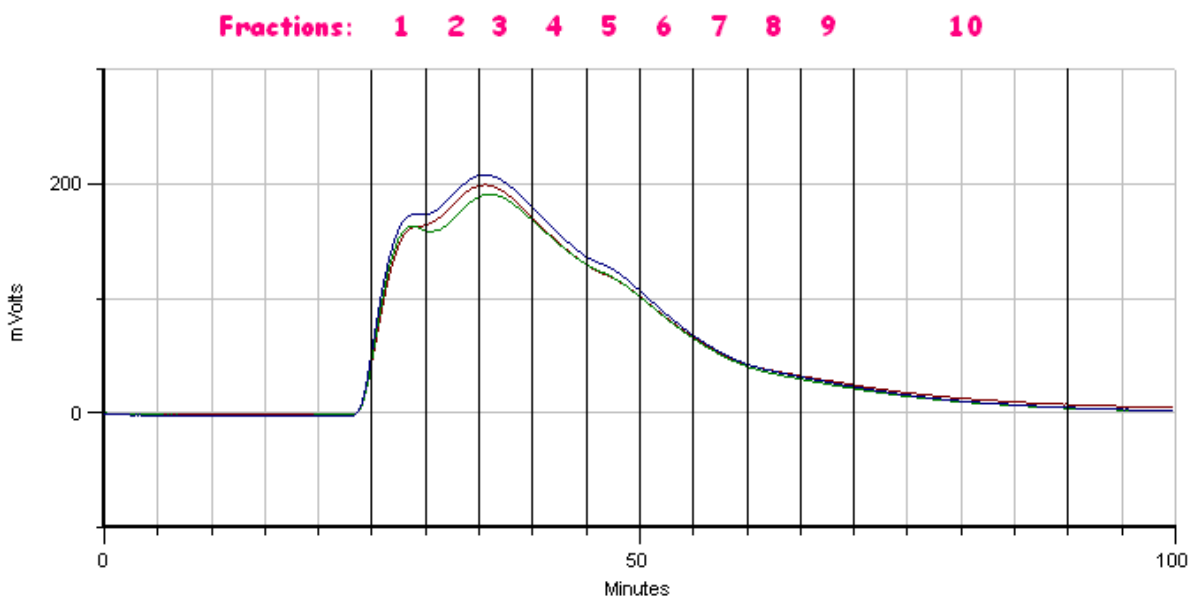
La **Figura 4.1** mostra che le componenti estraibili ammontano, nella loro totalità, a circa la metà del peso iniziale di **RES0**. **RES4** inoltre rappresenta circa un quinto del peso dell'HA. La massa in difetto (circa il 40%) è spiegabile in parte con le normali perdite di materiale associate ai trasferimenti (10%), in parte è il frazionamento che libera delle sostanze come gruppi metili che possono essere volatilizzate durante i processi di evaporazione o liofilizzazione, in parte è infine attribuibile a una parziale decarbossilazione delle componenti alchiliche acide, o la liberazione di molecole di acqua di occlusione.



4.5 Rese del frazionamento HPSEC del residuo finale (RES4) e aspetto del cromatogramma

La **Figura 4.2** mostra il profilo generale di un cromatogramma HPSEC ottenuto durante la separazione di frazioni a diverse dimensioni eseguita sul residuo **RES4**. La caratterizzazione delle frazioni separate per HPSEC sarà trattata in maggiore dettaglio nei capitoli successivi.

**Figura 4.2:** Cromatogrammi HPSEC di RES4 (in triplicato) rivelati per UV a 280 nm. In evidenza la numerazione delle frazioni a dimensioni progressivamente minori.



Il cromatogramma HPSEC mostrato in **Figura 4.2** evidenzia la presenza di tre principali picchi massimi di assorbimento, con un andamento compatibile con quanto generalmente riportato in letteratura per misure HPSEC di acidi umici (Piccolo *et al.*, 1999).

**Tabella 4.3:** Rese (mg) di frazionamento HPSEC in Figura 4.2

Frazione	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Totale raccolto	Iniettato
Peso	4.7	8.8	7.3	7.4	6.7	3.9	3.1	1.1	1.5	0.5	45.0	50.0

La **Tabella 4.3** rivela come le frazioni con maggiore assorbimento siano anche le più abbondanti. E' da notare che il residuo **RES4** assorbe arrivando anche oltre 200 mV di risposta strumentale (280 nm). In precedenza è stato osservato che il materiale HA-VICO di partenza (**RES0**), nonostante una concentrazione d'iniezione tre volte maggiore, raggiunge una risposta massima di poco maggiore a 100 mV (Baiano, 2006). E' evidente quindi come **RES4** interagisca molto più intensamente con la radiazione UV rispetto a **RES0**.

## CAPITOLO 5

### RISULTATI E DISCUSSIONE: ANALISI MS E NMR DI HA VICO

#### 5.1 Spettrometria di massa di HA Vico (RES0)

##### 5.1.1 Generalità

L'iniezioni di campioni umici in LC-MS è generalmente associata a distribuzioni complesse di segnali (Piccolo & Spiteller, 2003). La tecnica sfrutta una sorgente di ionizzazione *soft* come Elettrospray (ESI) per generare anioni degli umati. Questi anioni, una volta vaporizzati, sono rilevati da un analizzatore che li separa in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ).

I dati ottenuti con questo metodo per le HS sono sempre stati oggetto di discussione. Alcuni autori infatti attribuiscono i risultati a fenomeni di formazione di ioni multicarica (Leenheer *et al.*, 2001), la frammentazione delle molecole (McIntyre *et al.*, 1997) e la ionizzazione dipendente dalle masse (Stenson *et al.*, 2002). L'utilizzo della cromatografia HP-SEC in linea con lo strumento ha recentemente introdotto un'importante innovazione in quanto è in grado di disperdere il materiale organico in funzione del raggio idrodinamico, riducendo la complessità del materiale e i fenomeni di aggregazione.

Il miglioramento introdotto dall'utilizzo della separazione “ifenata” tuttavia ancora non basta a riconoscere specie molecolari conosciute nella complessità dei risultati. In questa trattazione si introduce l'utilizzo dello strumento LTQ Orbitrap (Thermo Finnigan) per l'analisi delle sostanze umiche. Questa trappola ionica di nuova generazione è dotata di grande sensibilità e potere di risoluzione (Hu *et al.*, 2005). Esso è composto da una trappola lineare (LTQ) e una più sofisticata trappola orbitale (Orbitrap). Lo strumento può operare in modalità LTQ, con la sola trappola lineare, o in modalità Orbitrap, con entrambi gli analizzatori in serie. Il funzionamento della trappola orbitale si basa su un potenziale radiale, un potenziale elettrostatico e un potenziale assiale.

Questi potenziali determinano l'oscillazione delle molecole all'interno della trappola. Queste oscillazioni possiedono tre frequenze, ciascuna correlata con uno dei tre potenziali. Una di queste frequenze, la frequenza assiale, è correlata in modo matematico alla radice dell'inverso del rapporto massa carica. Questo permette di misurare il rapporto massa carica degli analiti con un'operazione di trasformazione di Fourier. Questo strumento di concezione avanzata ha prestazioni notevoli, e pertanto si adatta bene all'analisi di campioni unici dalla notevole complessità. In questo capitolo tratteremo l'ottimizzazione delle condizioni di operatività dello strumento e i risultati dell'analisi del campione di HA Vico di partenza **RES0**.

### *5.1.2 Ottimizzazione del Metodo*

L'iniezione diretta dei campioni di HA ha prodotto una moltitudine di segnali di forma simile a una gaussiana (**Figura 5.1**) di difficile interpretazione. L'aumento del modificatore organico nella miscela di iniezione produce come effetto una riduzione del valore medio del rapporto massa carica e un aspetto molto più leggibile dei picchi formanti la distribuzione. L'utilizzo dello strumento in modalità trappola lineare (LTQ) o in modalità combinata LTQ con trappola orbitale (Orbitrap) produce risultati molto diversi. L'impiego dell'Orbitrap infatti sembra diminuire la sensibilità strumentale nei confronti degli analiti, aumentando tuttavia la risoluzione dei segnali che li contraddistinguono. Il confronto riportato in **Figura 5.1-3** evidenzia queste considerazioni e le confronta con i risultati della tecnica "ifenata".

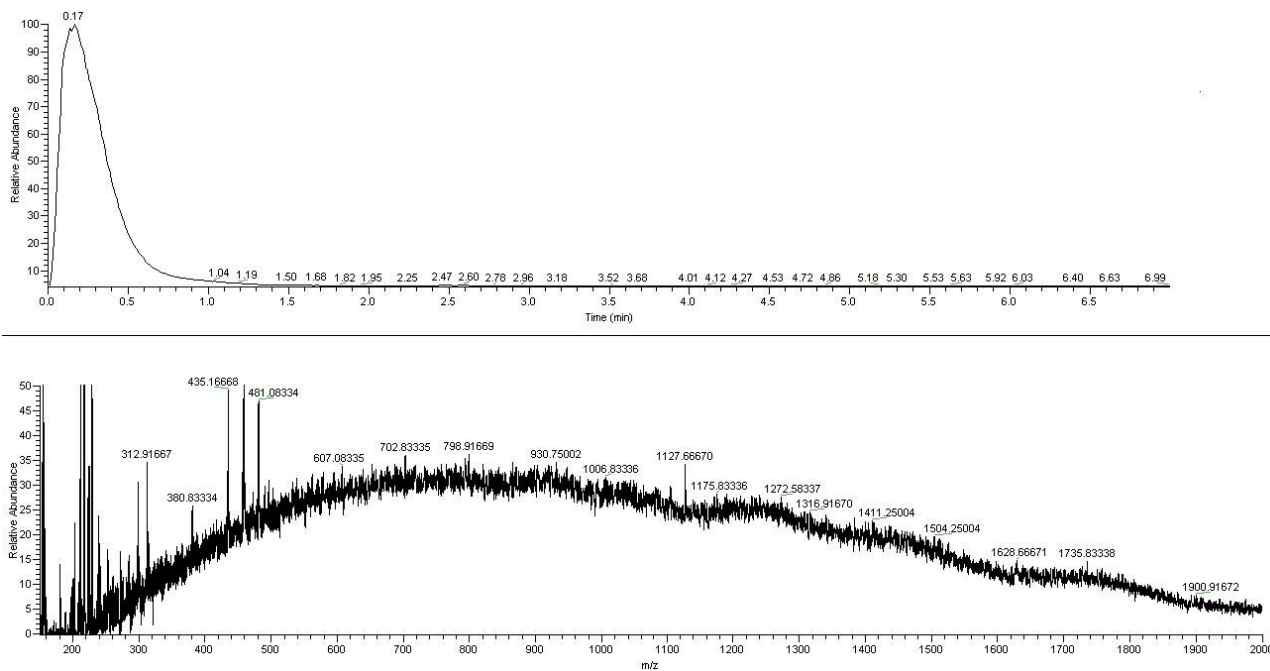
Le condizioni utilizzate per l'analisi dei campioni quindi sono la risultante di questo percorso di ottimizzazione progressiva. L'utilizzo di una quantità maggiore di acetonitrile evidentemente mitiga il fenomeno dell'associazione idrofobica tra le molecole delle miscele uniche e pertanto facilita la semplificazione degli aggregati molecolari nel momento in cui la soluzione è nebulizzata.

Il miglioramento introdotto dalla trappola orbitale (Schematizzata in **Figura 5.6**) invece è riconducibile al suo meccanismo di focalizzazione degli ioni, che richiede la stabilità degli stessi nella loro massa. Un segnale originatosi da un assembramento di molecole in aggregazione, coordinanti un certo numero di molecole di solvente, nel momento in cui perde una componente subisce una modifica del rapporto massa carica, e pertanto non sarà rivelabile dallo strumento. La trappola lineare dal canto suo ha una risoluzione inferiore e i meccanismi di focalizzazione più approssimativi risultano meno selettivi.

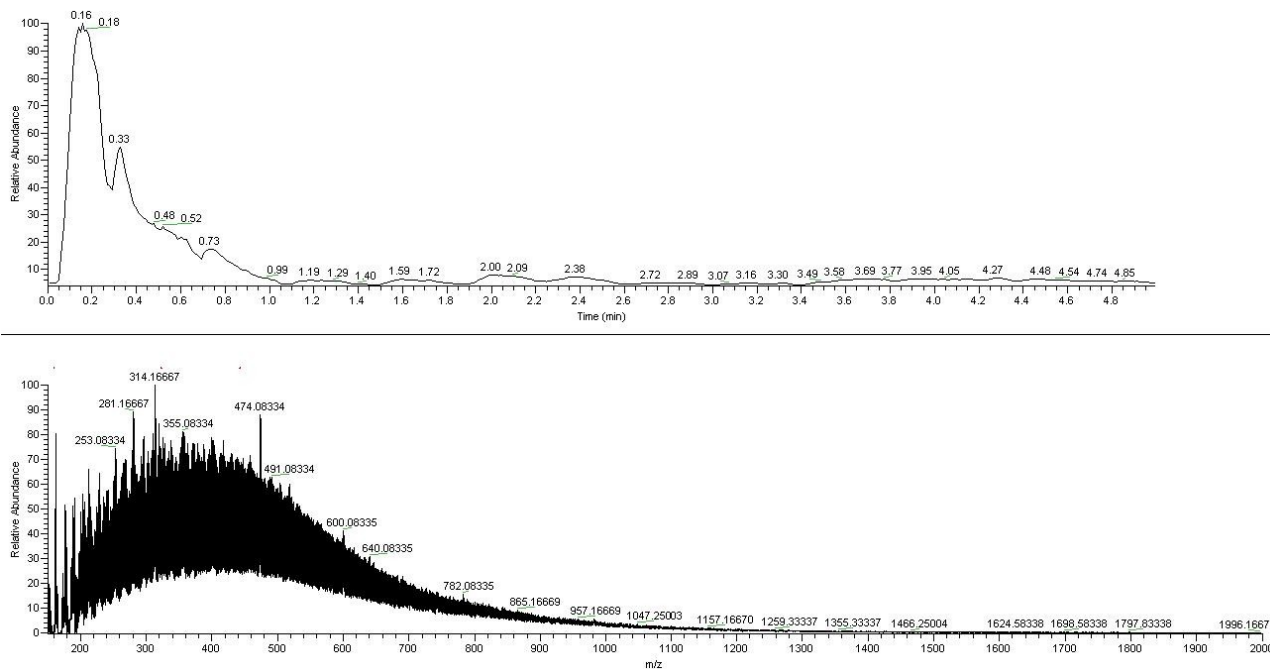
L'analisi accoppiata a una tecnica cromatografica HPSEC, come evidente in **Figura 5.4**, ha anch'essa un effetto positivo sulla qualità dei dati in termini di risoluzione e di definizione delle molecole nello spettro. In questo caso la spiegazione è insita nel meccanismo di separazione della fase stazionaria SEC. Gli aggregati infatti, entrando nei canali a diverso diametro che caratterizzano questa tecnica, non solo vengono separati in funzione del raggio idrodinamico, ma vengono anche dispersi all'interno delle sfere porose. Così viene a interrompersi l'equilibrio di aggregazione, con il risultato di privilegiare forme di aggregazione più semplici, per quel tempo che basta al compimento dell'analisi. Il fenomeno dell'isteresi, evidenziato anche nella precipitazione delle HS, è evidentemente estensibile alle dinamiche supramolecolari di formazione di aggregati.

La risultante di questi accorgimenti adottati contemporaneamente (HPSEC-Orbitrap-MS con alta percentuale di modificatore organico) è pertanto il metodo scelto per l'analisi dei campioni di HA-Vico.

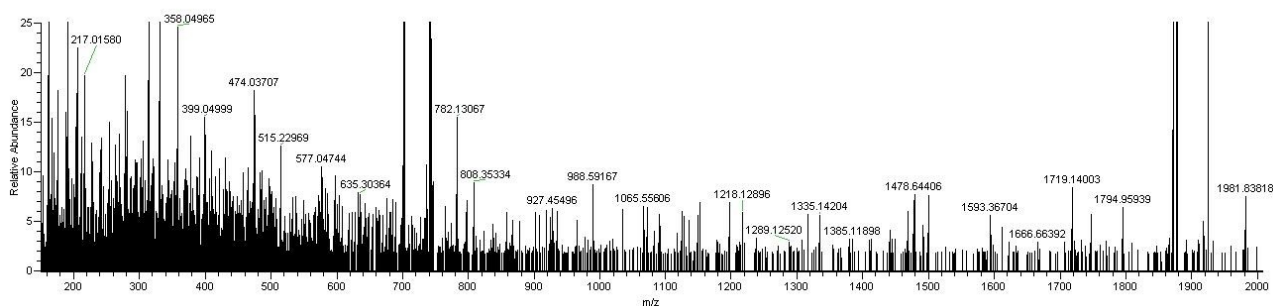
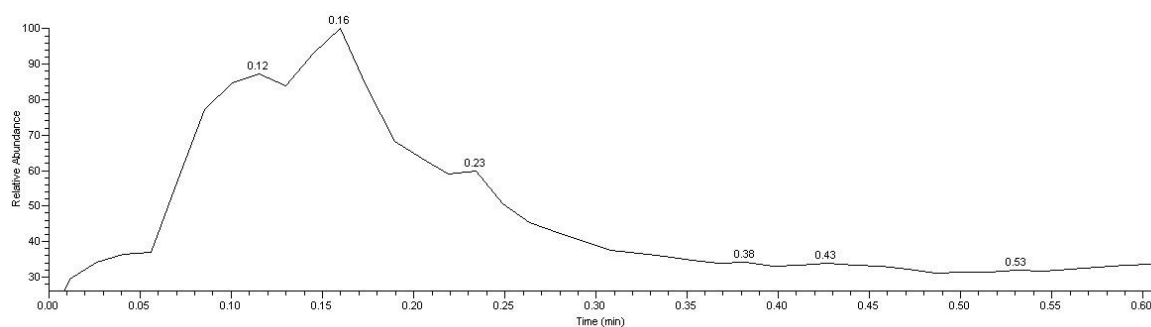
**Figura 5.1:** Spettrogramma di HA Vico in iniezione diretta. Eluizione: tampone pH=7/Acetonitrile (9:1, v/v) modalità: LTQ



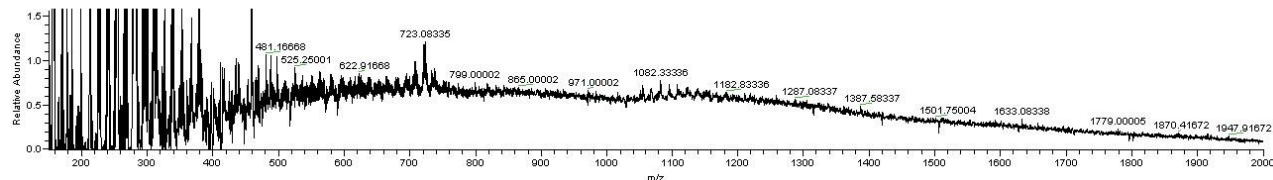
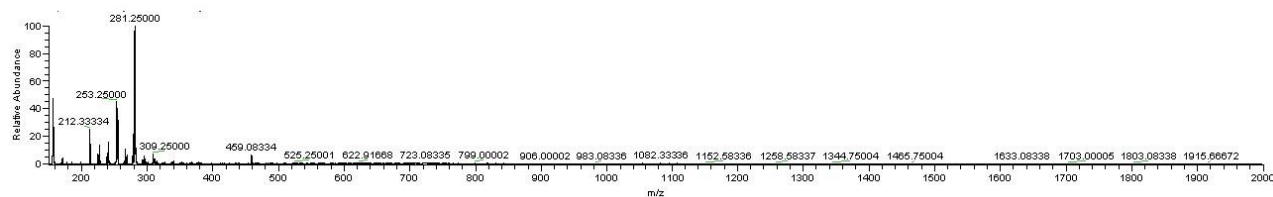
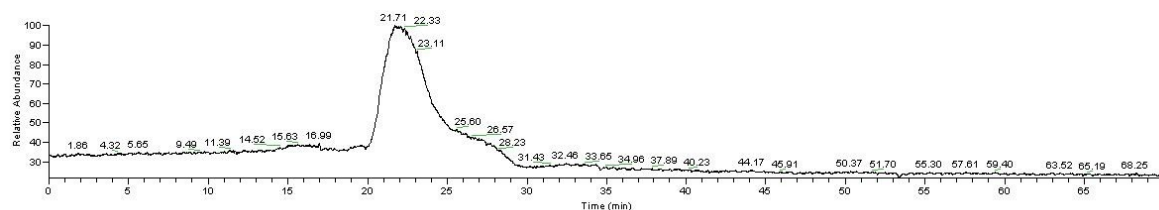
**Figura 5.2:** Spettrogramma di HA Vico in iniezione diretta. Eluizione: tampone pH=7/Acetonitrile (1:1, v/v) modalità: LTQ



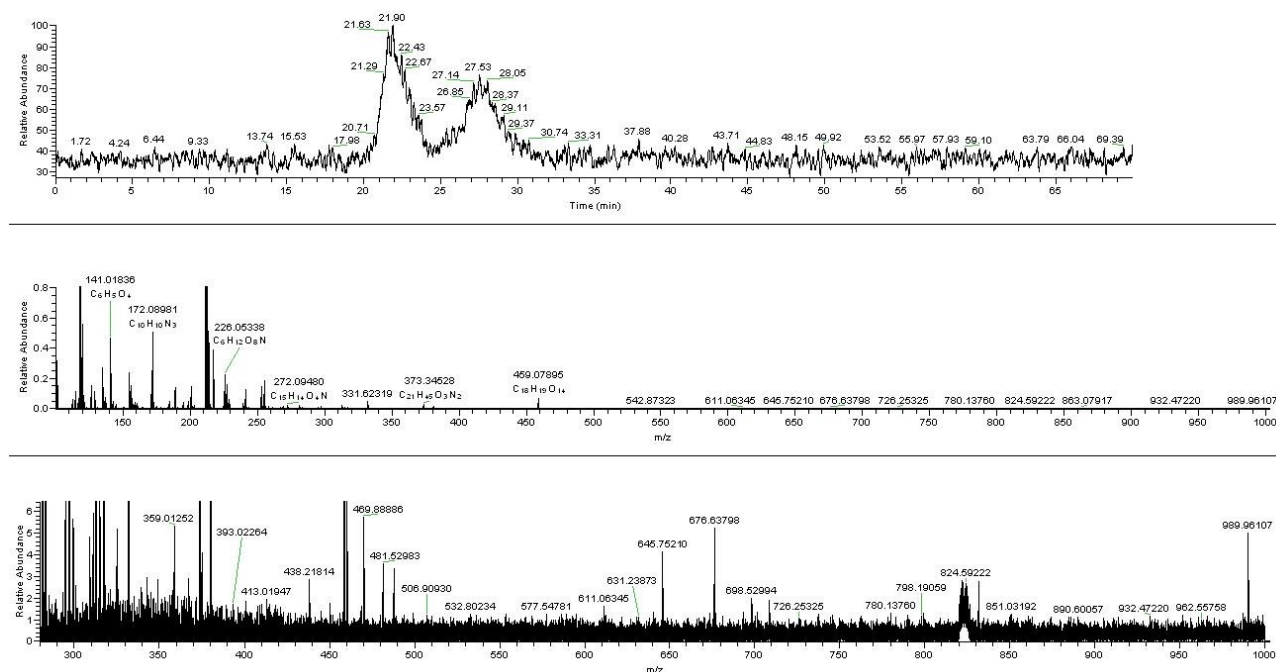
**Figura 5.3: Spettrogramma di HA Vico in iniezione diretta. Eluizione con tampone pH=7/Acetonitrile (1:1, v/v) modalità: LTQ+Orbitrap**



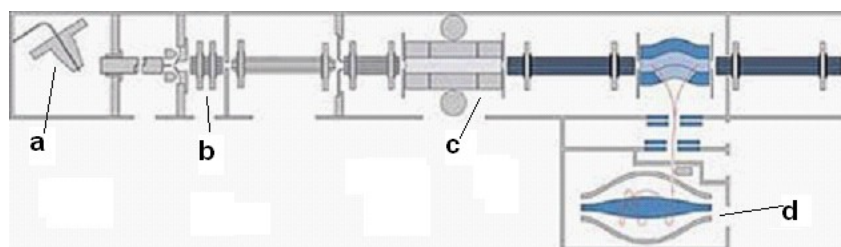
**Figura 5.4: Spettrogramma di HA Vico in analisi HPSEC-MS online. Eluizione con tampone pH=7/Acetonitrile (1:1, v/v) modalità: LTQ. Al centro: modalità integrale In basso: Ingrandimento sulla distribuzione continua.**



**Figura 5.5:** Spettrogramma di HA Vico in analisi HPSEC-MS online Eluizione: tampone pH=7/Acetonitrile (1:1, v/v) modalità: LTQ-Orbitrap. Al centro: modalità integrale In basso: Ingrandimento (distribuzione continua assente)



**Figura 5.6:** Rappresentazione schematica di uno strumento Orbitrap



**Legenda-a:** Sorgente; **b:** Lenti; **c:** Trappola lineare; **d:** Trappola orbitale

### 5.1.3 RES0: Analisi LC-MS, Aspetto generale

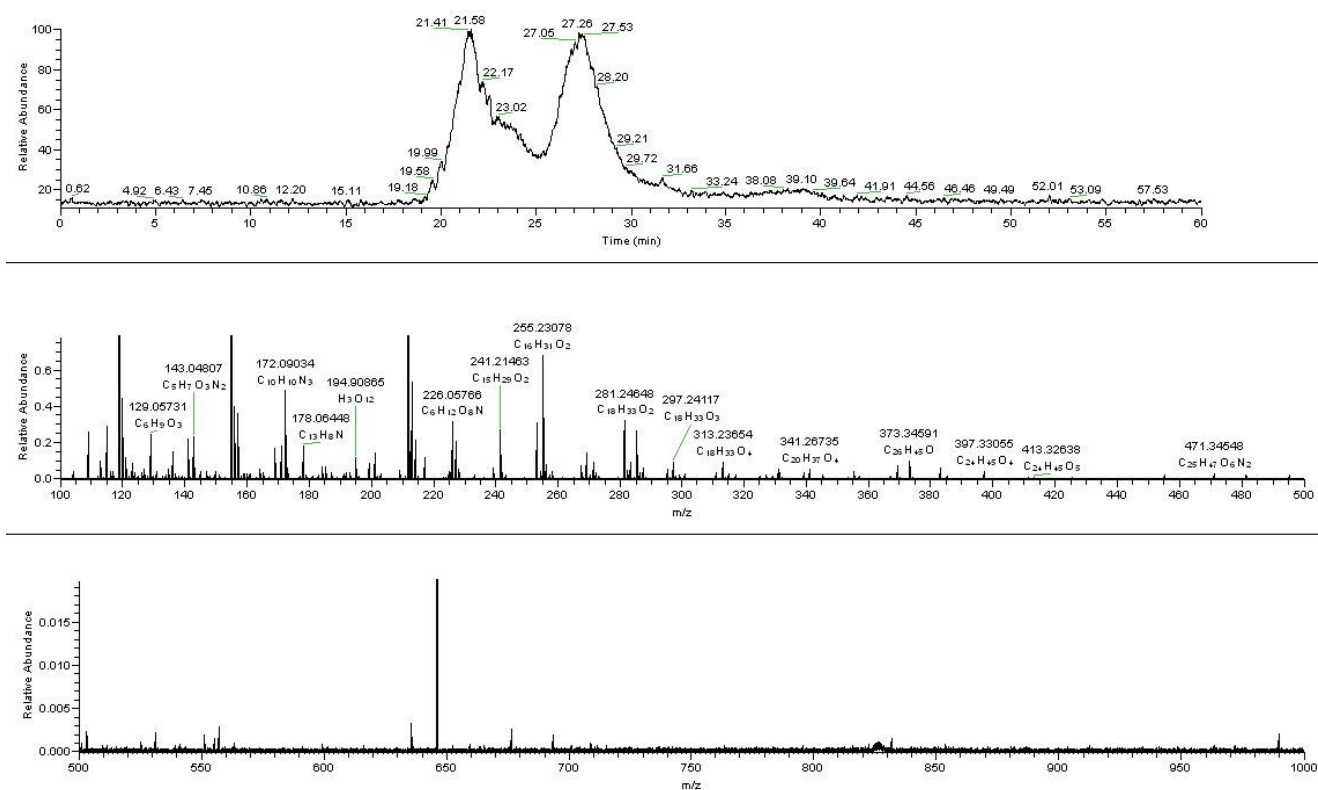
La **Figura 5.7** mostra un tipico spettrogramma di un campione di HA-Vico **RES0** con in risalto tre gruppi di picchi a tempi di ritenzione di circa 22, 28 e 39 nel TIC. Il primo picco presenta una spalla intorno a 23 min. I primi due picchi hanno intensità e aree comparabili, mentre l'ultimo invece risalta appena sul rumore di fondo. Non si registrano distribuzioni continue nell'intervallo di



massa utilizzato (100-2000 m/z). Lo spettro di massa in **Figura 5.7** (figura centrale), mostra una serie di raggruppamenti di picchi a distanze regolari, la cui stragrande maggioranza è dotata di una massa riconducibile a una formula bruta. Questo dato quindi esclude la possibilità che i segnali in studio siano generati da macromolecole a ionizzazione multipla.

Il prolungamento del tempo di cromatografia non ha prodotto ulteriori picchi nelle 3 ore successive all'iniezione, e l'iniezione di un bianco di controllo, ossia una soluzione ammoniacale priva di sostanze umiche, non ha evidenziato segnali significativi nel cromatogramma (non riportato).

**Figura 5.7:** Spettrogramma HPSEC-ESI-Orbitrap-MS (20 µg iniettati). In alto: cromatogramma con tre principali picchi (22 min, 28 min, 39 min), in risalto la spalla del primo picco a 23 minuti. Al centro e in basso: cromatogrammi relativi all'intero spettro delle regioni rispettivamente 100-500 Da e 500-1000 Da con le formule estrapolate dalla massa molecolare



#### 5.1.4 RESO: Analisi LC-MS, Analisi qualitativa

Nella **Tabella 5.1** sono riportati i composti riscontrabili dall'analisi qualitativa con associati i loro tempi di ritenzione. I dati mostrano una preferenza delle molecole dotate di due funzioni acide per tempi di ritenzione tra 22 e 24 minuti. Ad alcune di esse si potrebbe attribuire la caratteristica spalla del primo picco. Il composto che contribuisce in modo più evidente all'area del primo picco ha  $m/z$  217. Le molecole lineari monoacide sono maggiormente ritenute su colonna, e sono riscontrabili nel gruppo di segnali intorno a 28 minuti. Le specie chimiche idrossilate, rispetto ai loro omologhi privi di funzioni alcoliche, migrano più rapidamente. Inoltre, in una stessa serie, gli omologhi superiori sono maggiormente ritenuti. L'insaturazione delle molecole non sembra invece avere effetti rilevanti sui tempi di ritenzione, a parità di lunghezza della molecola. Questi elementi sembrano incompatibili con i principi della migrazione differenziale in esclusione molecolare. Infatti sono più propriamente attribuibili ad effetti di adsorbimento sulla fase stazionaria. Le molecole quindi sono più disponibili all'analisi, in quanto riescono ad abbandonare più facilmente i loro aggregati di origine e diffondere nei micropori della fase stazionaria. In tal modo, l'equilibrio con la conformazione ad alto raggio idrodinamico viene interrotto quanto basta a consentire l'analisi delle specie in MS. Esperimenti di HPSEC-MS offline, generano risultati molto meno definiti (Piccolo & Spiteller, 2003) in quanto la sostanza ha il tempo di riorganizzarsi a valle della separazione. Esperimenti di HPLC in fase inversa di queste sostanze non hanno portato risultati riproducibili, poiché almeno parte di esse si adsorbono sulla fase stazionaria C-18 in modo praticamente irreversibile (Dati non riportati). L'analisi HPLC delle sostanze uniche riportata in letteratura è sempre associata a notevoli difficoltà. Infatti le applicazioni per la separazione di HA in funzione della polarità sono piuttosto limitate, e comunque associate a condizioni di analisi non convenzionali, come l'uso di DMF come solvente (Hutta & Gora, 2003). Si è invece rivelata più affidabile una configurazione analitica tandem HPSEC-HPLC (Whelan *et al.*, 2005)

bidimensionale, ad ulteriore riprova dalle validità dell'esclusione molecolare nel risolvere la complessità molecolare degli HA.

#### 5.1.5 RES0: Analisi LC-MS, Categorie di molecole

Il materiale **RES0** può essere analizzato limitatamente per le molecole sensibili alla sorgente di ionizzazione ESI. Componenti importanti delle HS, quali idrocarburi, alcoli e zuccheri, non possono quindi essere rivelati con questa tecnica. La tecnica è invece sensibile alle sostanze acide, che sono anch'esse molto rappresentate in materiali umici. Le classi generalmente associate alle HS analizzate in MS comprendono acidi a struttura lineare o ramificata, saturi ed insaturi, sostituiti o meno con gruppi ossidrilici sulla catena; alcoli lineari; idrocarburi; acidi aromatici; aminoacidi; sostanze a nucleo terpenico, steroidi, chetoni (Grasset & Amblés, 1998b).

Le formule riscontrate in MS per il campione di HA sono state confrontate con gli esperimenti di GC-MS su estratti organici (Fiorentino, 2004; Baiano 2006) ottenuti dallo stesso suolo, allo scopo di identificarne la struttura. Tuttavia, non è sempre possibile definire la struttura assoluta, anche perchè gli isomeri costituzionali non sono risolvibili con una ionizzazione *soft* come l'ESI. In base a queste considerazioni, a molte formule brute si può associare facilmente una molecola generalmente associata alle HS, è ad esempio il caso delle sostanze già riscontrate nello stesso HA Vico in precedenti lavori (Fiorentino, 2004; Baiano, 2006) come acidi grassi lineari, ramificati, idrossilati e insaturi, e  $\alpha,\omega$  diacidi, dando per scontato che le molecole presentano tutte almeno una funzione carbossilica.

I composti si dividono in strutture lineari o cicliche. Sebbene poche siano le formule attribuibili a sostanze cicliche in base al loro indice di insaturazione e al profilo MS/MS, esse sono le più abbondanti tra le sostanze analizzate. Tra esse, di sicura caratterizzazione è l'acido benzoico, mentre le sostanze M-1=141, 155 e 217 non sembrano essere aromatiche, ma presentano un alto contenuto di ossigeno e numerosi orbitali  $sp^2$ . L'interpretazione di questi picchi per esperimenti di

MS/MS è trattata più approfonditamente oltre in questo capitolo. Le sostanze lineari invece hanno strutture più variabili. Esse sono state classificate in acidi saturi (lineari e ramificati), insaturi, idrossilati, idrossi-insaturi, diacidi e diacidi ossidrilati. Infine si trovano alcune strutture non identificate che possono rientrare in più di queste categorie. Gli acidi saturi hanno una lunghezza media tra gli otto (in ultra-tracce, non riportati) e i trenta atomi di carbonio, mentre gli acidi idrossilati hanno tra i quattordici e i ventiquattro atomi di carbonio. Sono presenti anche acidi di e tri-idrossilati a diciotto termini. Più modesta è la variabilità degli acidi insaturi, rappresentati da catene a quattordici, sedici o diciotto carboni. I loro analoghi idrossilati hanno un gruppo a catena breve, sei o sette termini, e uno a lunga catena, tra i quattordici e venti termini. Gli acidi dioici sono divisi in un gruppo a basso PM (C4, C6 e C9) e ad alto peso molecolare (C14-C24 a numero pari). Tra gli omologhi idrossilati sono rilevabili molecole tra sedici e ventiquattro atomi di carbonio. Gli acidi non definiti sono spesso a numero dispari di atomi di carbonio, ed in un caso sono anche presenti gruppi amminici, ma l'indice di insaturazione è in generale piuttosto alto. Alcuni tra questi potrebbero avere struttura terpenica. Sono state evidenziate sostanze non caratterizzabili fino a trenta atomi di carbonio. Questi dati sono ampiamente in accordo con l'origine forestale del suolo da cui il campione è stato ricavato, infatti esperimenti di in questi suoli il materiale alchilico è generalmente abbondante (Schoening & Koegel-Knabner, 2006; Ussiri and Johnson, 2007) con una preponderanza dei composti a sedici e diciotto termini che compongono le membrane cellulari, ma con un discreto contributo batterico come si evince dalla presenza di composti a numero dispari di atomi di carbonio (Kaneda, 1991).

**Tabella 5.1: Tempi di ritenzione (min) delle componenti molecolari di HA-Vico analizzate in HPSEC-Orbitrap-ESI-MS**

Acidi saturi	t <sub>ret</sub>	Idrossiacidi saturi	t <sub>ret</sub>	Acidi insaturi	t <sub>ret</sub>	Idrossiacidi insaturi	t <sub>ret</sub>
Ac decanoico	27-28	Ac idrossitetradecanoico	26-27	Ac tetradecenoico	27-28	Ac idrossiesenoico	25-26
Ac dodecanoico	27-28	Ac idrossipentadecanoico	26-27	Ac esadecenoico	27-28	Ac idrossieptenoico	25-26
Ac tetradecanoico	27-28	Ac idrossiesadecanoico	26-27	Ac ottadecenoico	27-28	Ac idrossitetradecenoico	27-28
Ac esadecanoico	27-28	Ac idrossieptadecanoico	26-27			Ac idrossipentadecenoico	26-27
Ac ottadecanoico	27-28	Ac idrossiottadecanoico	26-27			Ac idrossiesadecenoico	26-27
Ac pentadecanoico	27-28	Ac diidrossiottadecanoico	23-24			Ac idrossiottadecenoico	26-27
Ac eptadecanoico	27-28	Ac triidrossiottadecanoico	26-27			Ac idrossinonadecenoico	26-27
Ac eicosanoico	26-28	Ac idrossinonadecanoico	27-28			Ac idrossieicosenoico	27-28
Ac docosanoico	32-34	Ac idrossieicosanoico	26-27				
Ac tricosanoico	33-34	Ac idrossidocosanoico	27-28				
Ac tetracosanoico	34-36	Ac idrossitetracosanoico	26-27				
Ac triacontanoico	25-26						
Ac decanoico	27-28						
Diacidi	t <sub>ret</sub>	Diacidi idrossilati	t <sub>ret</sub>	Acidi ciclici	t <sub>ret</sub>	Altri acidi (Formula bruta)	t <sub>ret</sub>
Ac butandioico	23-24	Ac idrossiesadecandioico	23-24	C6H6O4	>48	C15H22O4	25-26
Ac pentandioico	23-24	Ac idrossiottadecandioico	23-27	C6H4O5	38-39	C16H35O4N3	26-27
Ac nonandioico	23-24	Ac idrossieicosandioico	23-24	Ac. benzoico	45-46	C17H26O4	25-26
Ac tetradecandioico	24-25	Ac idrossitetracosandioico	26-30	C7H6O8	20-21	C17H26O5	25-26
Ac esadecandioico	23-24	Ac idrossitetracosandioico	24-25			C18H26O4	26-28
Ac eptadecandioico	24-25					C20H24O3	25-26
Ac ottadecandioico	23-25					C21H26O3	25-26
Ac eicosandioico	23-25					C22H28O3	25-27
Ac docosandioico	24-25					C30H48O3	38-39
Ac tetracosandioico	24-26					C30H48O4	36-38

#### 5.1.6 RES0: Analisi LC-MS, Caratterizzazione quantitativa delle frazioni

Dall'analisi dei dati emerge che gli acidi saturi maggiormente rappresentati sono l'omologo C16 e i ramificati C15 e C17, di origine batterica (Kaneda, 1991). Gli analoghi idrossilati sono prevalentemente a numero pari di atomi di carbonio, e principalmente gli omologhi C16 e C18. Gli acidi insaturi, mostrano invece una netta prevalenza degli omologhi C18, probabilmente per l'abbondanza di acido oleico nelle membrane cellulari. Ciò è valido anche per gli analoghi idrossilati. Nel caso degli acidi difunzionali, le specie a sedici carboni sono invece maggiormente quantificate, benchè gli analoghi idrossilati C24 risultano essere più abbondanti. Gli acidi non

identificabili sono meno abbondanti, con i più importanti quantitativamente che sembrano essere C18 e C30. Tra gli acidi ciclici, il più rappresentato sembrerebbe avere la formula bruta  $C_6H_4O_5$ , benchè sia alquanto anomala e potrebbe derivare da un errore strumentale. Per evitare aberrazioni, questo dato non è stato inserito nei calcoli riguardanti la resa analitica e nel calcolo della composizione percentuale del campione. Questi risultati sono riportati in dettaglio in **Tabella 5.2**.

La trattazione quantitativa dei dati analitici delle HS è problematica in quanto anche le tecniche più avanzate soffrono di scarsa riproducibilità. La risposta di ciascuna molecola dipende da numerosi fattori. Fra questi, il più difficile da controllare è l'interferenza delle altre sostanze. L'eterogeneità delle HS moltiplica notevolmente le variabili del sistema (ovvero il numero di molecole potenzialmente interferenti). Per elaborare un modello alternativo sarebbe necessario essere già a conoscenza della composizione delle sostanze in analisi. Questo paradosso genera una sorta di “principio di indeterminazione” delle miscele eterogenee, in cui ricadono le sostanze umiche. La soluzione a questo ostacolo è la omogeneizzazione del campione per frazionamento.

**Tabella 5.2: Risultati quantitativi (µg/g di campione) dell'analisi HPSEC-Orbitrap-ESI-MS di HA RES0 con deviazioni standard percentuali**

Acidi saturi	µg/g	Dev. st. %	Idrossiacidi saturi	µg/g	Dev. st. %	Acidi insaturi	µg/g	Dev. st. %	Idrossiacidi insaturi	µg/g	Dev. st. %
Ac decanoico	109,5	26,8	Ac idrossitetradecanoico	81,4	7,4	Ac tetradecenoico	93,1	42,0	Ac idrossiesenoico	98,8	30,5
Ac dodecanoico	127,7	27,1	Ac idrossipentadecanoico	78,8	14,5	Ac esadecenoico	976,2	54,7	Ac idrossieptenoico	39,7	21,6
Ac tetradecanoico	490,5	47,1	Ac idrossiesadecanoico	389,3	10,5	Ac ottadecenoico	1392	31,5	Ac idrossitetradecenoico	40,3	53,4
Ac esadecanoico	2045	36,6	Ac idrossieptadecanoico	79,5	33,2				Ac idrossipentadecenoico	10,0	60,1
Ac ottadecanoico	280,8	7,3	Ac idrossiottadecanoico	65,0	15,7				Ac idrossiesadecenoico	206,9	59,1
Ac pentadecanoico	784,3	33,7	Ac diidrossiottadecanoico	92,2	19,9				Ac idrossiottadecenoico	424,6	67,1
Ac eptadecanoico	479,5	21,8	Ac triidrossiottadecanoico	251,6	7,1				Ac idrossinonadecenoico	21,5	14,5
Ac eicosanoico	50,6	13,1	Ac idrossinonadecanoico	29,8	14,6				Ac idrossieicosenoico	5,7	81,2
Ac docosanoico	126,3	4,5	Ac idrossieicosanoico	15,6	56,6						
Ac tricosanoico	28,8	12,8	Ac idrossidocosanoico	132,7	3,6						
Ac tetracosanoico	84,9	11,9	Ac idrossitetracosanoico	236,3	3,3						
Ac triacontanoico	75,6	21,4									
Ac decanoico	109,5	26,8									
Diacidi	µg/g	Dev. st. %	Diacidi idrossilati	µg/g	Dev. st. %	Acidi ciclici	µg/g	Dev. st. %	Altri acidi (Formula bruta)	µg/g	Dev. st. %
Ac butandioico	134,4	15,9	Ac idrossiesadecandioico	71,2	13,7	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	20917	48,8	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	18,2	43,8
Ac pentandioico	43,8	23,6	Ac idrossiottadecandioico	85,4	35,4	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	238483	10,8	C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> O <sub>4</sub> N <sub>3</sub>	29,0	19,2
Ac nonandioico	85,1	43,3	Ac idrossieicosandioico	53,8	12,2	Ac. benzoico	20447	13,0	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	6,8	43,9
Ac tetradecandioico	18,8	24,9	Ac idrossitetracosandioico	222,4	7,5	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	6050	8,3	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	8,3	34,8
Ac esadecandioico	1208	4,3	Ac idrossitetradecandioico	25,3	12,2				C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	438,9	73,4
Ac eptadecandioico	74,3	34,5							C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	31,4	30,0
Ac ottadecandioico	362,8	20,9							C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	44,2	25,4
Ac eicosandioico	237,1	11,4							C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	25,5	15,2
Ac docosandioico	336,9	6,3							C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	103,6	12,3
Ac tetracosandioico	178,2	7,3							C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	109,3	8,3

### 5.1.7 RES0: Analisi LC-MS, Rese quantitative analitiche strumentali

In **Figura 5.8-9** sono rappresentate in diagramma le rese delle analisi rispetto al materiale iniettato. Come si è accennato, una parte del materiale non è rilevabile dalla tecnica impiegata, e, pertanto, le rese rispetto alla quantità iniettata sono molto lontane dall'essere quantitative.

I risultati mostrano che solo il 6% della massa analizzata è stata rilevata dalla tecnica. Considerato che è associato all'analisi di un campione di HS non frazionato, questo dato è piuttosto incoraggiante. Inoltre, sono state riscontrate delle masse attribuibili a molecole vere e proprie, di cui

si conosce la formula bruta o in molti casi la struttura. Altri metodi di caratterizzazione di HA non ulteriormente trattati, non sono così efficienti.

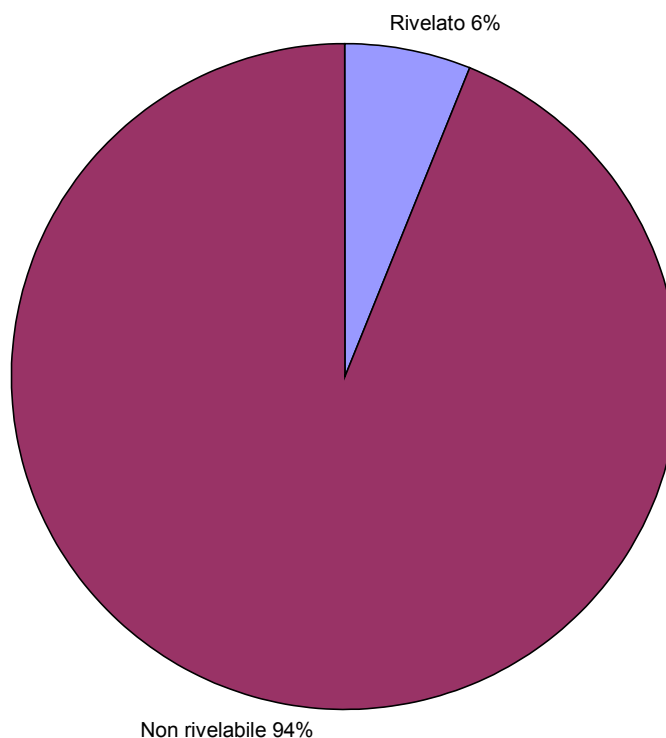
Il carbonio organico costituente il campione sembrerebbe essere prevalentemente composto da sostanze cicliche ossigenate, ad alto indice di insaturazione. Questo dato è da prendere con cautela, in quanto la tecnica di ESI-MS potrebbe essere più sensibile a queste sostanze per via di fenomeni attribuibili a diversa ionizzazione o vaporizzazione.

La composizione inoltre mostra che il contributo in massa dei diversi tipi di acidi lineari è ben bilanciato. Avendo queste molecole una risposta reciprocamente comparabile, il dato è piuttosto affidabile, nonostante sussistano problemi di riproducibilità.

Per un'analisi più affidabile della composizione del campione, sono stati acquisiti spettri  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR in fase solida, questa tecnica infatti non dipende da fenomeni di aggregazione.

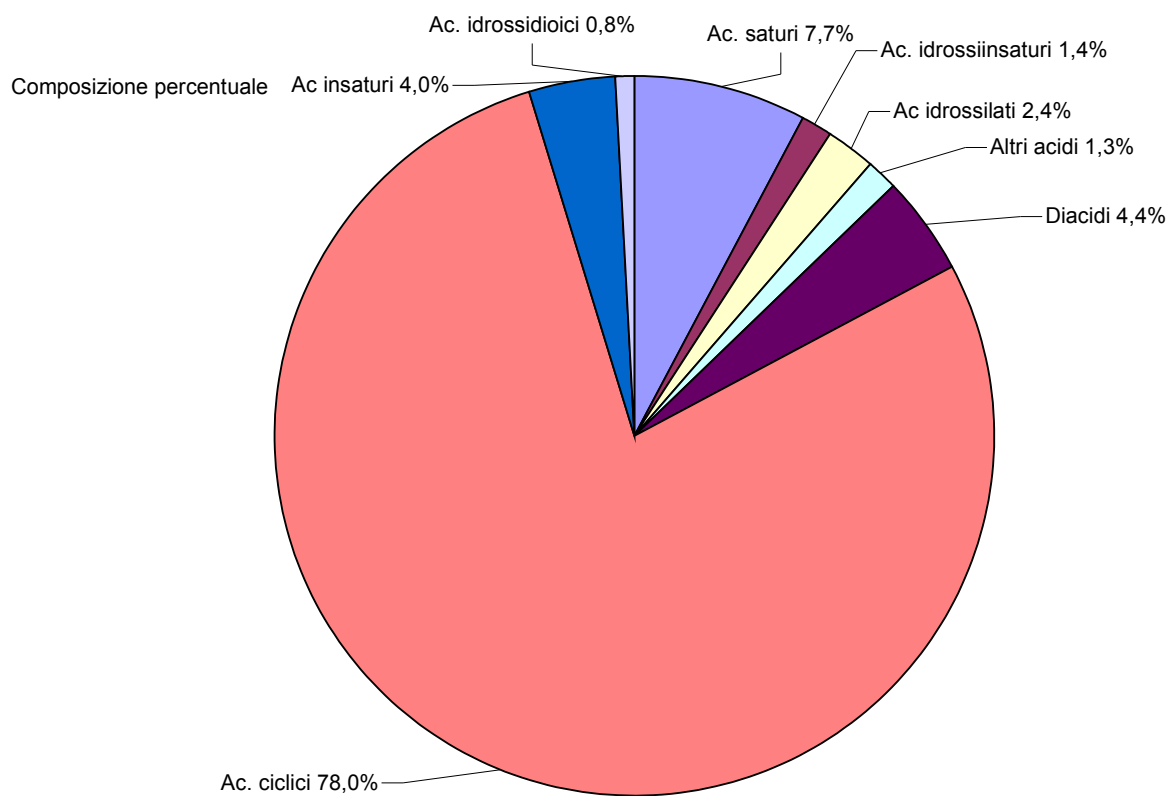
**Figura 5-8: Resa generale di rivelabilità come rapporto tra sommatoria su tutte le sostanze rivelate e massa iniettata**

Resa generale dell'analisi vs quantità iniettata





**Figura 5-9: Composizione percentuale delle sostanze rivelabili per HPSEC-ESI-Orbitrap-MS in HA-Vico (RES0)**

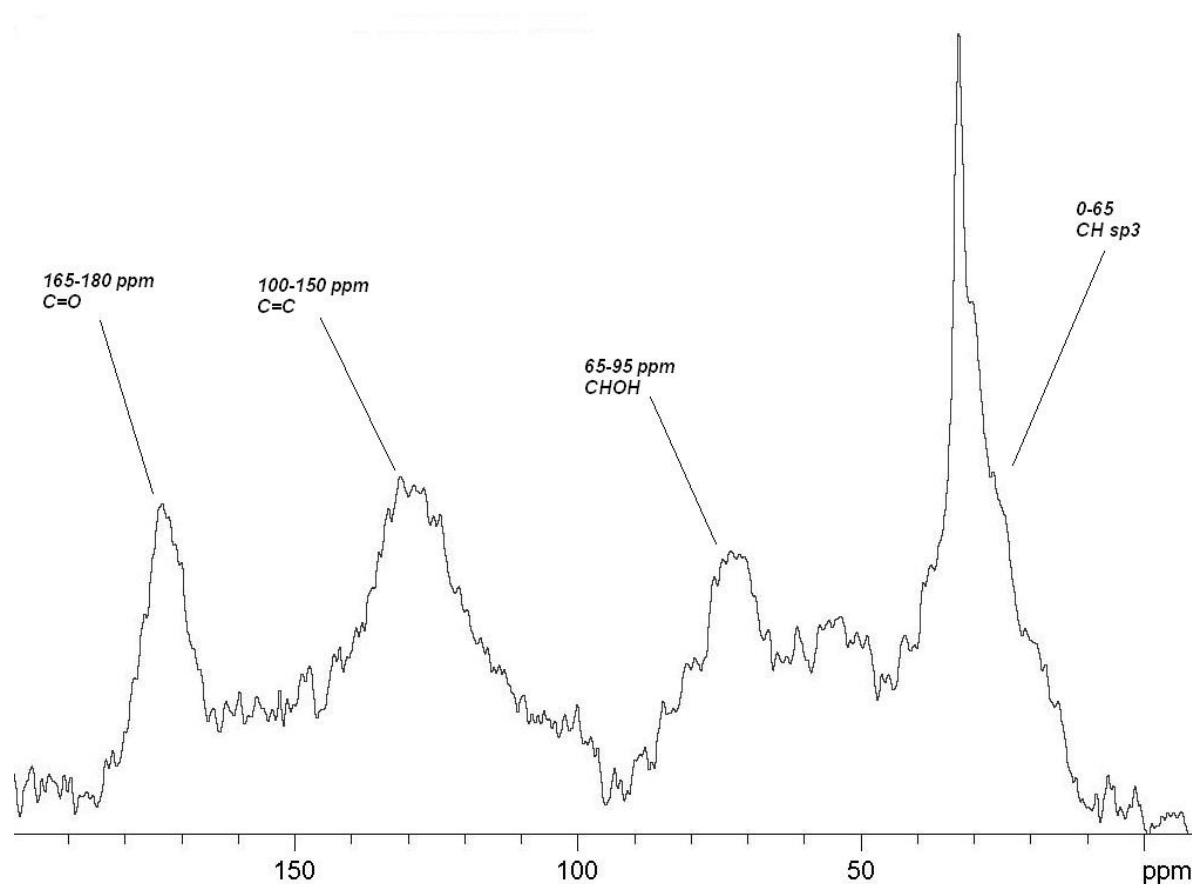


## 5.2 Spettroscopia $^{13}\text{C}$ CP-MAS NMR di HA Vico (RES0)

Dallo spettro CP-MAS del campione di HA-Vico purificato (**Figura 5.10**) emerge la composizione eterogenea di questo materiale organico. Sono presenti quattro principali gruppi di segnali, riconducibili a carboni di tipo alifatico, saccaridico/idrossialchilico, olefinico/aromatico e carbonilico/carbossilico. Il primo gruppo di carboni alchilici/alifatici ha un'area relativa lievemente maggiore. La ricchezza in tali carboni è caratteristica molto comune nei suoli organici e di origine forestale (Schoening & Koegel-Knabner, 2006; Ussiri and Johnson, 2007), mentre l'area relativa degli altri gruppi è comparabili. La moltitudine di molecole presenti nel materiale di partenza emerge da questo spettro in modo molto meno chiaro che nella tecnica ESI-MS. Tuttavia, l'affidabilità della tecnica CPMAS-NMR per la caratterizzazione della SOM *in toto* la rende complementare alla spettrometria di massa.

Questo materiale è sottoposto al frazionamento descritto nella sezione sperimentale. Da esso si generano una serie di frazioni per estrazione sequenziale. Ciascuna di queste frazioni è analizzata con le tecniche che più si adattano alle caratteristiche chimico fisiche del materiale che le compone. Il processo di frazionamento è finalizzato ad omogeneizzare le componenti del sistema e ridurre quindi le interferenze.

**Figura 5.10: Spettro CP-MAS di HA Vico non frazionato (RES0)**



### 5.3 Analisi di estratti di frazionamento (ORG1, ORG2, ACQ2, ORG3)

In questa sezione sono trattati i risultati di analisi strumentale delle componenti dell'HA-Vico che sono estraibili dalla matrice attraverso trattamenti chimici di estrazione con solventi organici o reazioni di scissione di legami idrolizzabili. Il primo passaggio, descritto nella sezione Materiali e Metodi, prevede l'estrazione della componente non legata in modo chimico alla matrice. Questa componente organosolubile (**ORG1**) è stata analizzata per GC-MS ed NMR con lo scopo di caratterizzarne la composizione molecolare.

Il secondo passaggio di idrolisi del legame estere per trattamento con trifluoruro di boro, genera un estratto metanologico di sostanze legate debolmente alla matrice, che è stato ulteriormente ripartito per estrazione liquido/liquido in una frazione organica (**ORG2**) e una acquosa (**ACQ2**).

Per la prima è stato usato il medesimo approccio che per l'estratto della componente libera, per la seconda è stata preferita l'analisi HPSEC-ESI-MS come per il materiale di partenza.

Il terzo passaggio di reazione, la metanolisi alcalina, ha rilasciato un estratto metanolico di componenti fortemente legati alla matrice, il quale è stato anch'esso sottoposto alla metodica di ripartizione liquido/liquido come per la componente debolmente legata alla matrice. È stato così ottenuto un estratto organosolubile (**ORG3**) e una frazione idrosolubile, quest'ultima è gravimetricamente irrilevante e fortemente contaminata da sostanze inorganiche e pertanto non è stata presa in considerazione. Questa componente è stata analizzata per GC-MS e NMR.

Il passaggio di lisi del legame etere avrebbe dovuto prodotto un estratto di componenti tenacemente legate alla matrice, ma in questo caso non è stato isolato alcun materiale organico, esso è forse composto da ioduri alchilici a basso PM che non si prestano alla caratterizzazione con le tecniche da noi impiegate.

## **5.4 Analisi MS di componenti libere organosolubili (ORG1)**

### *5.4.1 Aspetti generali*

La componente libera è costituita dalle molecole non legate strutturalmente alla matrice umica, ma associate per mezzo di interazioni deboli. L'impiego di una miscela di solvente alogenato e di metanolo garantisce la solubilizzazione di composti di varia polarità. L'estratto è stato analizzato previa derivatizzazione delle funzioni più polari come ossidrili e carbossili formando derivati metilici e trimetilsililici. Le aree dei picchi del cromatogramma sono state confrontate con standard esterni per quantificare ciascuna componente. Per facilitare l'analisi, il campione è stato separato in due frazioni a polarità differente mediante trattamento SPE su silice a fase diretta. Sono state inoltre sperimentate diverse condizioni di reazione al fine di ottimizzare il processo di derivatizzazione. Sono state stimate le rese dell'analisi delle componenti per confronto

con il materiale iniettato. Sono stati valutati gli effetti sulle misure delle diverse condizioni di derivatizzazione sperimentate e della separazione SPE.

#### 5.4.2 ORG1: Analisi GC-MS, Aspetti qualitativi

La componente libera è composta principalmente da acidi grassi saturi, a struttura lineare o ramificata, acidi insaturi, acidi idrossilati,  $\alpha,\omega$  diacidi, alcoli lineari a lunga catena, idrocarburi, acidi aromatici, aminoacidi, carboidrati e composti del metabolismo secondario delle piante come steroli e terpeni.

I risultati sono riassunti nella **Tabella 5.3**. Gli acidi grassi saturi lineari sono presenti ad una lunghezza variabile a seconda delle condizioni di analisi. Per i campioni sililati in piridina (**pyr**) sono stati rilevati composti a nove, sedici, diciotto e venti atomi di carbonio, presenti come derivati metilici o TMS. La sililazione in dimetilformammide (**dmf**) ha rilevato invece omologhi da sedici a venti termini. La funzionalizzazione in presenza del solo sililante (**sil**) senza co-solvente ha messo in evidenza sostanze di ampio intervallo molecolare, da dodici a ventotto carboni. Gli acidi grassi tendono ad eluire prevalentemente nella prima frazione SPE (**lip**), dal carattere più lipofilo. Sono stati riscontrati anche composti a numero dispari di atomi di carbonio. La frammentazione ha evidenziato che si tratta di sostanze con ramificazione in posizione iso e anteiso, di origine batterica (Kaneda, 1991). Le derivatizzazioni **pyr** e **dmf** hanno rivelato composti a C15 e C17 lineari. In particolare, in **dmf** si registrano C17 e C18 in configurazione iso. I campioni **sil** invece mostrano risposta migliore, con isomeri iso e anteiso a quindici e diciassette termini. Queste sostanze, come gli analoghi lineari, sono eluite nella frazione **lip**.

Gli acidi grassi idrossilati sono presenti nei campioni **pyr** e **dmf** in lunghezze da quattordici a diciotto atomi di carbonio, con sostituzione singola o doppia, terminale e non (vedere dettagli in **Tabella 5.4a-c**), mentre nell'approccio **sil** si rivelano solo composti a sedici e diciotto atomi con funzioni ossidrili terminali. L'eluizione preferenziale per questa classe è nella frazione **lip**. I

composti mono o poliinsaturi mostrano una migliore rivelabilità con derivatizzazione **sil**. In questo caso, infatti, si riscontrano il maggior numero di analoghi rispetto all'uso dei cosolventi.

I composti insaturi sono esclusivamente a catena C18, e sono scarsamente ritenuti dalla silice a fase diretta, e si trovano anch'essi nella frazione **lip**. Gli alcoli lineari, analizzati come trimetilsililesteri, sono presenti a lunghezza variabile tra dodici e ventidue termini, e sono ben rappresentati in derivatizzazione **pyr** e **sil**, ma meno con l'approccio **dmf**. Si riscontrano maggiormente nella frazione **lip**.

Gli acidi difunzionalizzati sono tra i composti più difficilmente misurabili con la tecnica GC-MS a causa di una risposta strumentale molto modesta. Essi sono prevalentemente accumulati nella frazione **lip**, e sono scarsamente rivelabili per derivatizzazione **sil**. L'uso di cosolventi produce risultati lievemente migliori ma comunque mediocri. Mentre gli idrocarburi non derivatizzati dovrebbero risentire meno degli effetti di cosolvatazione, la tecnica di MS ha difficoltà a rilevarli, ma la derivatizzazione **pyr** sembra risolvere il problema.

Gli acidi aromatici di vario tipo sono presenti con struttura benzoica o cinnamica nella frazione **ORG1** e portano sostituenti metossili e ossidrili (TMS) in orto, para, e, in alcuni casi, anche meta,. Si riscontrano anche acidi ftalici e isoftalici nella derivatizzazione **pyr** e **dmf**. Essi sono piuttosto apolari e infatti sono maggiormente rappresentati in **lip**.

Un numero notevole di sostanze polioidrossilate, in particolar modo saccaridi a cinque o sei atomi di carbonio, sono riscontrate nella frazione **ORG1**. L'analisi dei frammenti non può confermare la struttura per cui esse sono state classificate per tempo di ritenzione. Questi derivati possono originarsi da precursori zuccherini, ma anche da sostanze polioidrossilate come acido citrico, aminozuccheri, inositolo e acidi saccaridi. La derivatizzazione **pyr** ha prodotto risultati di gran lunga superiori alle altre condizioni. Questi composti sono riscontrabili soprattutto nella seconda frazione che è eluita in presenza di metanolo/cloroformio 3:1, e che definiamo **hyd** perché più idrofila. La derivatizzazione **pyr** ha inoltre messo in evidenza la presenza di un amminoacido,

l'alanina, come derivato sililato. Infine una sostanza di origine terpenica è stata riscontrata in presenza di cosolventi **pyr** e **dmf**, si tratta dell'acido deidroabietico come trimetilsililestere, di origine vegetale. Si tratta di uno dei costituenti delle resine dei lecci che tipicamente popolano la vegetazione sul suolo Vico.

L'utilizzo della SPE su silice per l'omogeneizzazione, rispetto al più consueto supporto aminopropilico (Gutierrez *et al.*, 1998; Fiorentino *et al.*, 2006), produce da un lato risultati positivi, in quanto accumula abbastanza selettivamente le sostanze idrofiliche nella frazione più polare, e, rispetto alla silice funzionalizzata con gruppi amminici, non trattiene irreversibilmente parte dell'estratto. Tuttavia la risposta dei composti alla GC-MS delle due frazioni **lip** e **hyd** risulta nella maggior parte dei casi inferiore all'estratto di partenza. Ciò può essere dovuto a tracce di silice che interferirebbero con la derivatizzazione. Infatti, l'utilizzo del metanolo in alte concentrazioni per facilitare la completa eluizione dell'estratto produce una parziale solubilizzazione della fase stazionaria. Il supporto in silice può comunque essere utile per concentrare la frazione idrofila per analizzarne i carboidrati.

**Tabella 5.3: Principali categorie di composti costituenti l'estratto ORG1 associati alla frazione SPE di eluizione preferenziale e le migliori condizioni di derivatizzazione riscontrate**

Categoria	Ac. lineari	Ac. ramificati	Ac insaturi	Ac idrossilati	Alcoli	Poliidrossilati	Ac. aromatici	Idrocarburi	Diacidi	Terpeni	Aminoacidi
SPE	lip	lip	lip	lip	lip	hyd	lip	hyd	lip	lip	hyd
Sililante	sil	sil	sil	pyr, dmf	sil, pyr	pyr	pyr, dmf	pyr	pyr, dmf	pyr, dmf	pyr

**Legenda:**

**SPE:** Frazione SPE con maggior quantità di composto

**Sililante:** Condizioni di sililazione ottimali

**sil:** Reagente sililante

**pyr:** Piridina con 3% sililante

**dmf:** Dimetilfomamide con 3% sililante e 1% piridina

**lip:** Frazione lipofila (3:1 cloroformio:metanolo)

**hyd:** Frazione idrofila (3:1 metanolo:cloroformio)

#### 5.4.3 ORG1: Analisi GC-MS, Aspetti quantitativi

Gli acidi lineari più abbondanti in tutte le condizioni di derivatizzazione sono risultati quelli a sedici e diciotto atomi di carbonio. Gli altri tipi di acidi sono meno abbondanti con una distribuzione simil-gaussiana, benchè cresce l'abbondanza per gli omologhi superiori C24-28. Il contributo maggiore per gli acidi ramificati è dato dal C15, più rappresentato nella forma iso, mentre l'omologo superiore è più presente come anteiso.

Negli acidi insaturi si registra la netta preponderanza della struttura dell'acido oleico, con un buon contributo di acidi di-insaturi. Gli acidi idrossilati sono meno rappresentati rispetto ai composti già citati, con la struttura più importante data da C16 con ossidrile terminale. I di-acidi sono i meno rappresentati degli acidi alifatici, tra cui il più importante, rivelato solo in **dmf**, risulta quello con struttura a 19 termini. Su questa classe comunque gravano problemi di derivatizzazione e di rivelabilità in colonna.

Gli acidi aromatici più importanti sono i 3,4 disostituiti (dimetossi e metossi-idrossi) con un buon contributo di 4-monoidrossi, che risulta però il più importante se il campione è derivatizzato in **dmf**. Altri acidi benzoici e cinnamici sono presenti in basse concentrazioni. Gli alcoli seguono una distribuzione simil gaussiana con un massimo corrispondente all'omologo a sedici termini. Come osservato anche per gli acidi lineari, l'abbondanza tende a crescere per gli omologhi oltre i venti termini.

I composti idrocarburici (alcani/alcheni) sono poco rappresentati in questo materiale, e seguono una distribuzione simil-gaussiana con un massimo corrispondente ai più abbondanti omologhi a tempo di ritenzione 29.2 e 31.2 minuti. Le sostanze poli-idrossilate, anche esse ordinate per tempo di ritenzione, sono molto abbondanti, in particolar modo se consideriamo la derivatizzazione **pyr**. Le più abbondanti corrispondono a RT 8.8 e 15.8, attribuibili molto probabilmente a ribosio e glucosio, rispettivamente. Occorre però notare che le scale dei tempi di ritenzione non sono uniformi per i metodi cromatografici utilizzati per **sil**, **pyr**, e **dmf**.



Infine, si registra un notevole contributo di acido deidroabietico specialmente in **pyr**, e una quantità trascurabile di alanina, rilevata in **pyr**. La rivelabilità di questo ultimo composto è molto influenzata dalle condizioni di formazione dei derivati trimetilsililestere, i quali si idrolizzano con una cinetica molto rapida. Infatti, se ne può apprezzare la presenza solo in condizioni di anidricità dei solventi utilizzati per le procedure, benché anche in queste condizioni la velocità di idrolisi degli addotti è tale che si osserva, nell'ambito delle repliche di una stessa analisi, un calo della risposta in funzione del tempo. Per questo motivo, ai fini dell'analisi quantitativa, è stata presa in considerazione solo la prima replica in ordine di tempo.

Questi risultati sono riassunti in maggior dettaglio nella **Tabella 5.4a-c**.

**Tabella 5.4: Risultati GC-MS quantitativi delle componenti principali di ORG1 ( $\mu\text{g/g}$ ) e relative deviazione standard percentuali. Idrocarburi e sostanze polioidrossilate sono indicate con il loro tempo di ritenzione**

**Tabella 5.4a: Sililazione senza cosolvente (1 replica)**

<u>Ac. lineari</u>	<u><math>\mu\text{g/g}</math></u>	<u>Alcoli</u>	<u><math>\mu\text{g/g}</math></u>
Ac dodecanoico	94.52	Dodecanolo	532.53
Ac tetradecanoico	844.49	Tetradecanolo	524.00
Ac esadecanoico	42831.73	Esadecanolo	2480.97
Ac eptadecanoico	505.40	Ottadecanolo	980.40
Ac ottadecanoico	26118.88	<u>Eicosanolo</u>	419.71
Ac eicosanoico	1109.49	<u>Composti polioidrossilati</u>	
Ac docosanoico	911.29	RT 14.3	105.54
Ac tetracosanoico	4418.98	RT 14.6	19.87
Ac esacosanoico	6255.41	RT 15.1	257.71
Ac ottacosanoico	4904.43	RT 15.4	9.10
<u>Ac. ramificati</u>		RT 15.6	10.10
Ac pentadecanoico anteiso	765.09	RT 15.8	7.75
Ac pentadecanoico iso	590.61	RT 16.2	18.26
Ac eptadecanoico anteiso	380.30	RT 16.4	6.27
Ac eptadecanoico iso	511.52	RT 16.6	48.99
<u>Ac insaturi</u>		RT 18.0	37.11
Ac oleico	73320.13	RT 18.4	8.53
Ac ottadecenoico	6922.58	RT 19.2	13.57
Ac linoleico	5672.82	RT 19.5	4.90
Ac ottadecadienoico (1)	1048.30	RT 19.7	8.22
Ac ottadecadienoico (2)	1690.50	RT 19.8	5.14
<u>Ac idrossilati</u>		RT 20.0	17.45
Ac $\omega$ -idrossi esadecanoico	2882.91	RT 20.2	32.36
Ac $\omega$ -idrossi ottadecanoico	13.25	RT 20.5	175.53
<u>Ac. aromatici</u>		RT 21.3	118.61
Ac. 4-idrossibenzoico	729.85	RT 21.6	312.73
Ac. 4-idrossi, 3-metossibenzoico	2793.22	RT 21.7	92.59
Ac. 3,5-dimetossi, 4-idrossibenzoico	5247.59	RT 23.6	137.30

**Tabella 5.4b: Sililazione in piridina con 3% sililante (6 repliche)**

Ac. Lineari	µg/g	dev. st.	Composti poliossidrilati	µg/g	dev. st.
Ac nonanoico	74.81	34.17	Ac tartarico	69.87	34.94
Ac pentadecanoico	301.37	68.04	RT 6.2	142.09	29.30
Ac esanoico	11425.50	45.76	RT 6.3	88.41	32.02
Ac eptanoico	33.68	79.68	RT 6.5	793.76	27.50
Ac ottanoico	8615.88	40.48	RT 6.7	233.14	47.12
Ac eicosanoico	315.35	87.56	RT 7.2	549.21	77.74
<b>Diacidi</b>			RT 7.3	778.22	43.54
Ac esandioico	76.89	65.54	RT 7.9	574.98	35.35
<b>Ac insaturi</b>			RT 8.2	2890.40	30.94
Ac linoleico	395.02	38.76	RT 8.5	1108.83	31.93
Ac oleico	9367.14	59.39	RT 8.8	6165.01	29.64
Ac ottadecenoico	754.68	191.84	RT 9.0	614.07	30.31
<b>Ac idrossilati</b>			RT 9.4	2802.35	29.52
Ac-ω-idrossitetradecanoico	494.48	48.36	RT 9.6	129.61	43.43
Ac-ω-idrossitetraesanoico	1995.62	56.90	RT 9.9	56.81	45.47
Ac-α/β-idrossiesadecanoico	397.75	42.82	RT 10.0	864.57	32.82
Ac-9,10-diidrossiottadecanoico	299.34	68.49	RT 10.1	324.20	39.10
<b>Ac aromatici</b>			RT 10.3	362.73	35.24
Ac 4-idrossibenzoico	344.01	25.10	RT 10.6	3143.47	31.17
Ac 3,4-diidrossibenzoico	1317.79	38.59	RT 10.8	119.48	47.61
Ac Isoftalico	143.87	69.59	RT 11.0	1385.20	31.76
Ac 3,5-dimetossi, 4-idrossibenzoico	408.23	51.85	RT 11.2	231.54	58.04
<b>Idrocarburi</b>			RT 11.6	309.15	37.12
RT 23.2	141.54	74.96	RT 11.7	404.97	32.72
RT 25.2	289.78	117.16	RT 12.8	127.86	43.59
RT 27.2	495.53	141.42	RT 12.9	64.20	30.20
RT 29.2	683.48	152.06	RT 13.0	167.75	48.02
RT 31.2	705.36	170.97	RT 13.1	298.75	33.56
RT 33.2	622.32	149.46	RT 13.2	341.96	44.34
<b>Alcoli</b>			RT 13.5	5502.74	26.96
Dodecanolo	106.78	29.52	RT 13.7	374.48	50.05
Tetradecanolo	265.77	40.80	RT 14.2	554.93	36.67
Petadecanolo	190.33	71.60	RT 14.7	93.73	54.31
Esadecanolo	350.41	35.65	RT 14.8	103.71	47.55
Ottadecanolo	677.26	40.78	RT 15.0	234.92	36.94
Eicosanolo	483.24	40.25	RT 15.2	1545.73	40.49
Docosanolo	750.05	48.64	RT 15.8	15245.05	29.29
<b>Aminoacidi</b>			RT 16.1	419.31	42.34
Alanina	283.74	46.74	RT 16.3	5310.15	28.88
<b>Terpeni</b>			RT 16.7	225.60	43.21
Ac. Deidroabietico	20656.67	N/A	RT 16.8	251.38	55.59
			RT 18.2	298.60	58.11
			RT 18.3	182.62	43.33
			RT 18.4	299.20	40.21

**Tabella 5.4c: Sililazione in dimetilformammide con 3% sililante 1% piridina (6 repliche)**

Ac lineari	µg/g	dev. st.	Ac aromatici	µg/g	dev. st.
Ac pentadecanoico	138.36	129.25	Ac. 4-idrossibenzoico	9682.41	129.45
Ac esadecanoico	3526.89	22.69	Ac. 3-idrossi, 4-Metossibenzoico	562.04	29.53
Ac ottadecanoico	8278.28	20.10	Ac. ftalico	488.57	49.24
Ac eicosanoico	348.31	28.77	Ac. 3,4-diidrossibenzoico	485.60	33.45
Ac docosanoico	816.82	33.20	Ac. tereftalico	1247.80	45.07
Ac ramificati			Ac isoftalico	4832.85	53.68
Ac eptadecanoico iso	84.76	47.94	Ac. 4-idrossicinnamico	93.99	62.58
Ac ottadecanoico iso	1020.60	144.91	Alcoli		
Diacidi		49.41	Esadecanolo	118.44	18.95
Ac ottandioico	355.93		Ottadecanolo	268.05	26.37
Ac nonandioico	181.04	23.99	Eicosanolo	292.65	54.20
Ac nonadecandioico	505.06	36.00	Terpeni		
Ac insaturi		20.93	Ac. Deidroabietico	10512.49	N/A
Ac oleico	6339.16	126.68	Composti poliossidrilati		
Ac linoleico	238.37		RT 6.3	563.22	23.77
Ac ottadecenoico	414.48	38.48	RT 8.3	1526.85	32.58
Ac ottadecadienoico	61.75	25.49	RT 8.4	234.73	88.81
Ac idrossilati		31.71	RT 9.4	66.62	92.26
Ac ω-idrossitetradecanoicoOTMS	198.41	130.56	RT 10.6	3314.11	26.70
Ac ω-idrossiesadecanoicoOTMS	2103.90		RT 10.8	244.66	24.41
Ac 10,16-diidrossiesadecanoico	481.72	81.13	RT 11.0	2389.63	29.70
Ac 9,10-idrossiottadecanoico	1810.97	22.13	RT 13.2	223.19	41.27

#### 5.4.4 ORG1: Rese del processo di analisi

Le rese dell'analisi quantitativa con i diversi approcci descritti (**sil**, **pyr** e **dmf**), intese come rapporto tra la massa complessiva delle sostanze caratterizzate ed il peso dell'estratto o dell'acido unico di partenza, sono messe a confronto tra loro e con i dati presenti in letteratura, al fine di valutare le migliori condizioni di derivatizzazione.

I dati mostrano come l'azione del cosolvente migliora la derivatizzazione di molti composti, ma influenza in modo negativo la risposta di altri. L'effetto di questi solventi è quello di favorire la solvatazione degli aggregati esponendo le funzioni più polari all'effetto del reagente sililante. La piridina inoltre ha un effetto catalizzante per la reazione di sililazione favorendo lo scambio protonico degli ioni ossonio negli intermedi di reazione. Per questo motivo, una piccola quantità (1% v/v) è addizionata alla dmf nel metodo di solvatazione analogo. I composti maggiormente affetti da questo incremento si sono rivelati, per **pyr** e **dmf**, gli zuccheri e le sostanze idrossilate, gli acidi aromatici, i diacidi, gli acidi idrossilati e l'acido deidroabietico, mentre alcani e alanina sono

visibili solo a seguito di derivatizzazione **pyr**. Le sostanze polidrossilate sono molto prontamente sililate in presenza di piridina per catalisi, ed è un effetto anche qualitativo perchè consente di rivelare sostanze a bassa concentrazione, che in altri casi sono sotto il limite di rivelabilità.

Gli acidi aromatici sono tra le poche classi che mostrano maggiore risposta strumentale per sililazione in **dmf**. Infatti l'affinità con il nucleo aromatico della piridina dovrebbe favorire la solvatazione, ma evidentemente la parziale separazione di carica sul gruppo ammidico ha un effetto positivo sulla disponibilità degli acidi aromatici alla reazione. I diacidi e le gli idrossiacidi, avendo due funzioni da derivatizzare, ed essendo anche una sola funzione libera in grado di comprometterne la volatilità nella separazione GC, traggono giovamento da una sililazione più efficiente e da un ambiente più anidro. L'anidricità è come già descritto in precedenza responsabile della rivelabilità dell'acido deidroabietico, ma è probabile che ci sia un contributo positivo anche per effetto della migliore solvatazione di questa sostanza che è dotata di proprietà surfattanti.

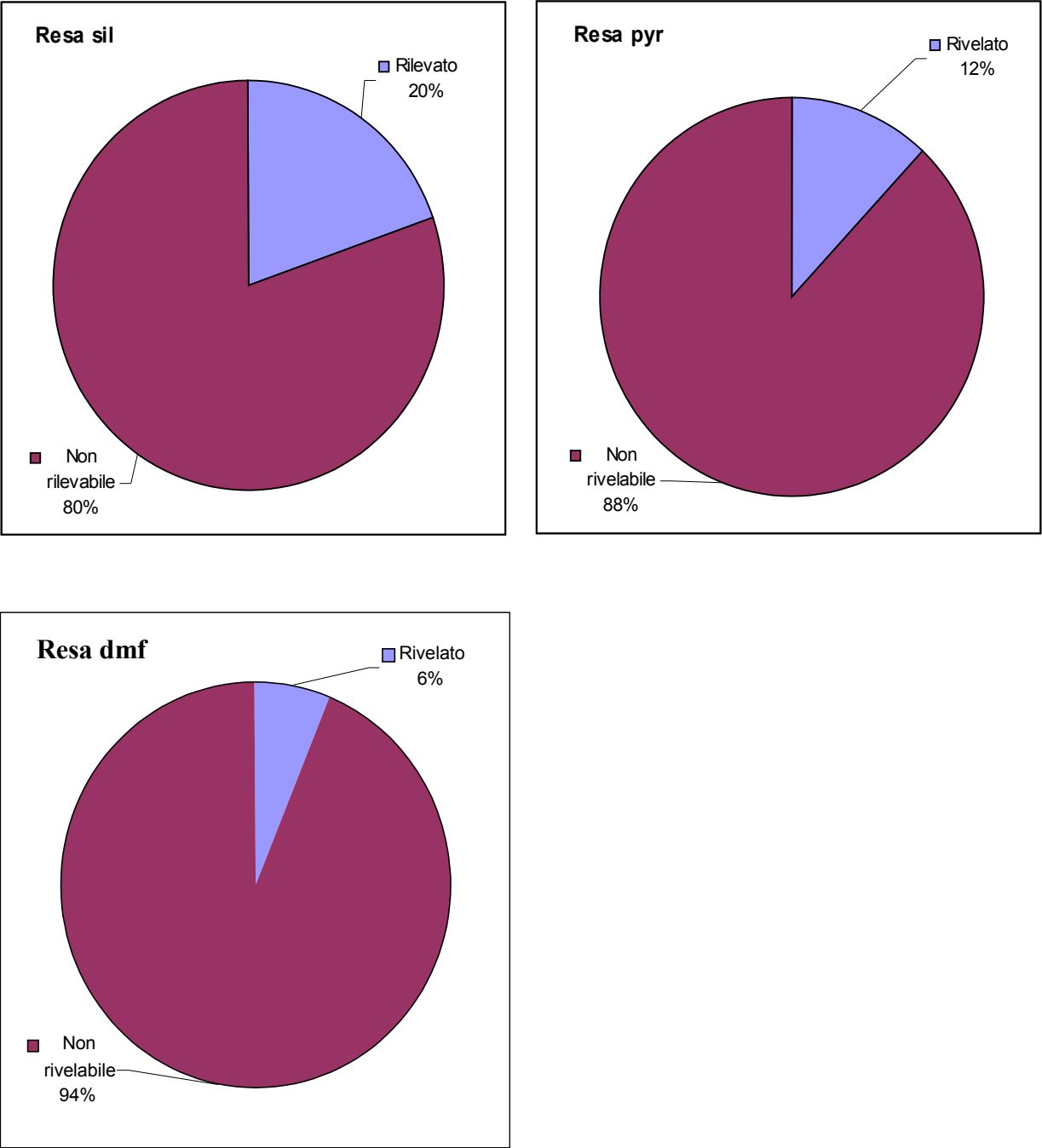
La ragione per cui sostanze non derivatizzabili e lipofile come gli idrocarburi risultano più rivelabili in condizioni di derivatizzazione più adatti alle sostanze idrofile non è chiara. Un'ipotesi è che la derivatizzazione delle sostanze idrofile del campione liberi idrocarburi precedentemente intrappolati. Un fenomeno simile è stato riportato in relazione a uno studio sulle umine, che a seguito della rottura enzimatica della cellulosa rilasciano idrocarburi non estraibili prima del trattamento (Grasset & Amblès, 1998c). L'alanina, avendo un gruppo amminico protonabile, reagisce con gli acidi utilizzati nelle derivatizzazioni, e non può perciò reagire a livello del suo doppietto di elettroni dell'atomo di azoto se non in un solvente alcalino come la piridina. La derivatizzazione è comunque modesta, per via della minore energia del legame azoto-silicio (295 kJ/mol) rispetto al legame Si-O (369 kJ/mol) che rende le sostanze ossigenate substrati migliori per la reazione di sililazione. La presenza di tracce di dimetilammina e acido formico nella dmf è probabilmente responsabile dell'idrolisi degli addotti azoto-silicio. Per tutte le altre sostanze, come

gli acidi lineari e insaturi, in cui la derivatizzazione prevalente è la metilazione, la risposta è superiore negli esperimenti in cui la derivatizzazione avviene in assenza di cosolvente.

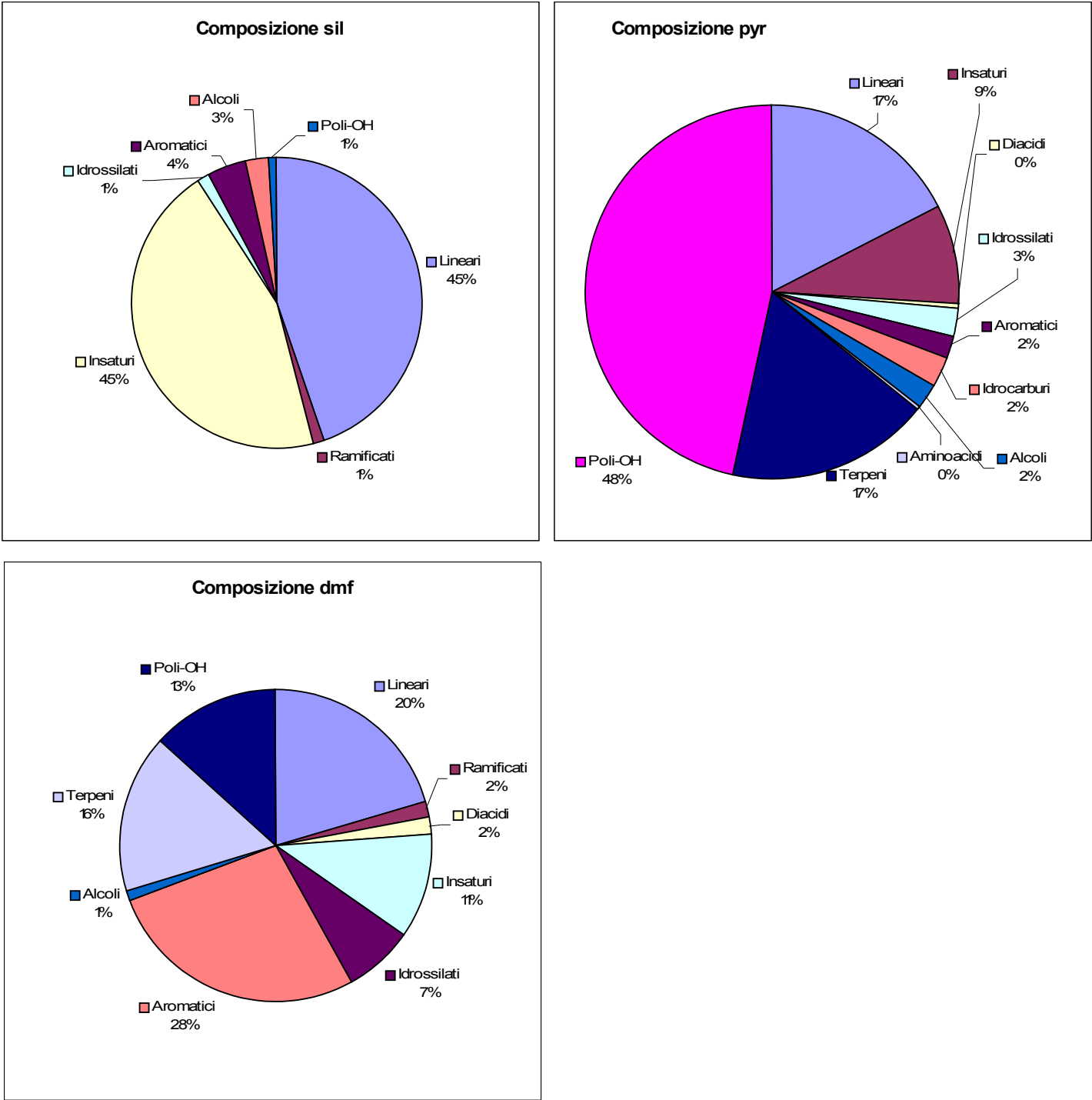
In tutti i casi citati di modulazione della risposta in funzione del metodo **sil** o **pyr**, in alternativa potrebbe giocare un ruolo positivo o negativo la bassa volatilità dei solventi piridina e dmf nella corsa gascromatografica.

Guardando alla risposta strumentale complessiva del campione rispetto al peso della sostanza organica totale, i metodi più quantitativi si distinguono nell'ordine **sil>pyr>dmf**. Il metodo **dmf** è nel complesso non adatto alla caratterizzazione di queste sostanze, a meno che l'interesse non sia incentrato sulle sole sostanze aromatiche, per le quali comunque non risulta molto migliore di **pyr**. Per l'analisi della componente libera (**ORG1**) il metodo **sil** è nel complesso il più adatto per identificare e misurare gli acidi saturi, insaturi e ramificati. Per tutte le altre sostanze è da preferire il metodo **pyr**. Nelle **Figure 5.11a-b** sono mostrate rispettivamente la resa analitica rispetto al materiale **ORG1** totale, e la composizione molecolare relativa alla parte rivelabile.

**Figura 5.11a:** Confronto tra rese (%) del processo analitico rispetto alla quantità totale di ORG1 per i metodi utilizzati



**Figura 5.11b: Composizione molecolare (%) di ORG1 in riferimento alle categorie molecolari riscontrate nei tre diversi metodi analitici**





## 5.5 Spettroscopia NMR di componenti libere organosolubili (ORG1)

### 5.5.1 ORG1: Spettroscopia $^{13}\text{C}$ NMR in fase solida

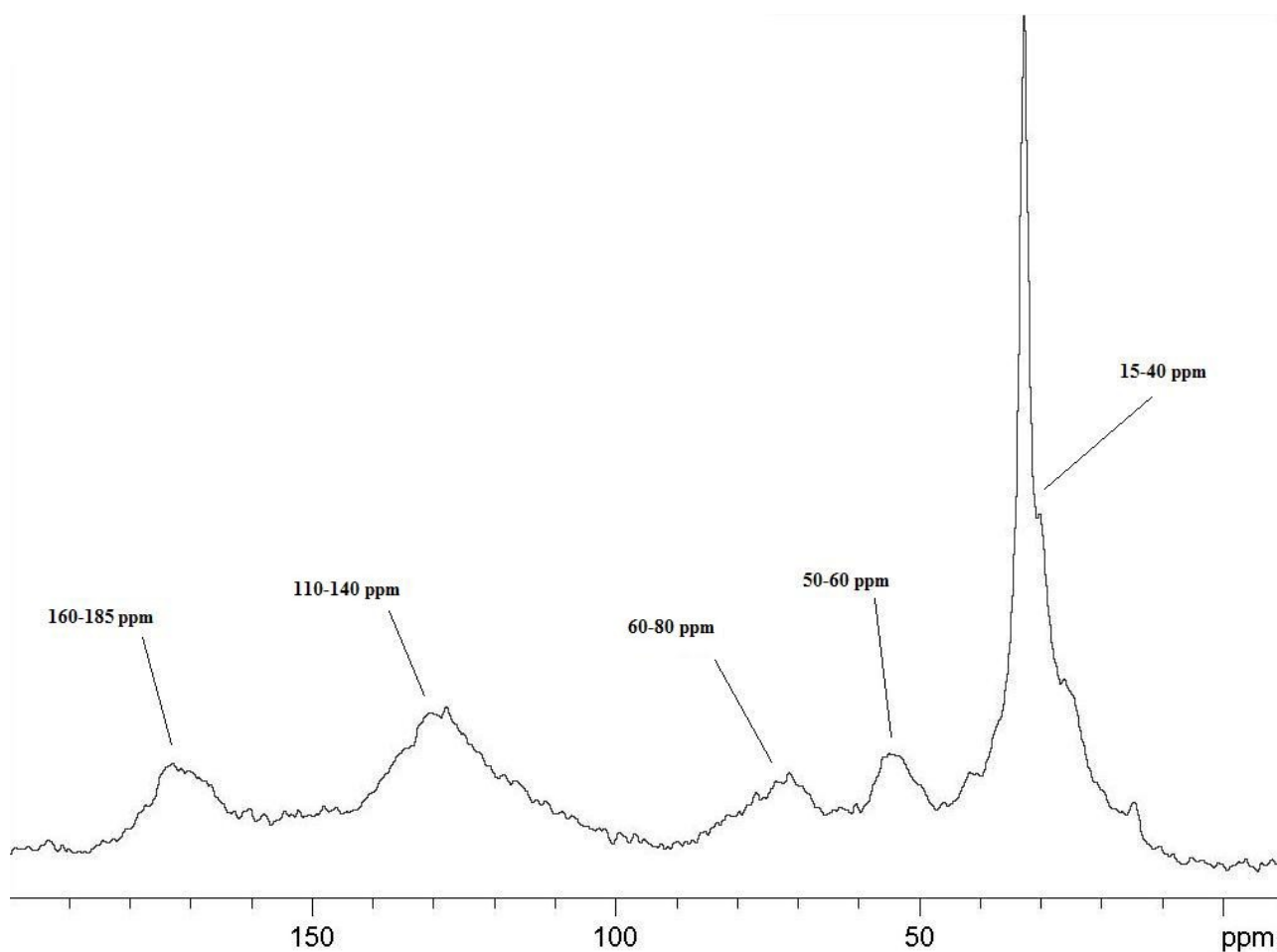
L'analisi Cross Polarization Magic Angle Spinning (CP-MAS) del carbonio del campione ORG1 ha evidenziato la presenza di cinque principali regioni spettrali. Cominciando dalla parte sinistra dello spettro (**Figura 5.12**) osserviamo un gruppo di segnali oltre 150 ppm attribuibili ai carbossili/carbonili, tra 100 e 150 ppm troviamo i carboni aromatici e olefinici, tra 60 e 80 ppm una regione attribuibile a segnali di carboidrati, tra 50 e 60 ppm i carboni alchilici ossigenati di alcoli ed eteri, sotto i 45 ppm si riscontra la regione dei carboni alifatici.

Il campione analizzato sotto il profilo NMR quindi è costituito dalle categorie di sostanze che sono state estratte con la componente non legata covalentemente alla matrice. Osserviamo che questo materiale è composto per la maggior parte da carboni alifatici, e in misura minore da funzioni meno lipofile quali acidi aromatici, alcoli e zuccheri.

Essendo l'osservazione della sostanza organica **ORG1** attraverso la tecnica NMR compatibile con i dati GC-MS, ciò conferisce a questo approccio analitico una certa validità.

Il materiale legato alla matrice in modo non covalente è prevalentemente alifatico, esso evidentemente interagisce per interazioni deboli di van der Waals o interazioni idrofobiche con i segmenti più lipofili della matrice. Il contatto prolungato con i solventi ne ha determinato il passaggio in soluzione.

**Figura 5.12:** Spettro  $^{13}\text{C}$  NMR CP-MAS di ORG1 (ppm)



#### 5.5.2 ORG1: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione

L'analisi della risonanza magnetica protonica di **ORG1** ha evidenziato le principali classi molecolari sotto il punto di vista degli atomi di idrogeno. Le principali categorie che emergono dallo spettro sono, da sinistra (**Figura 5.13**) i protoni aromatici (6.0-9.0 ppm), olefinici (5.0-6.0 ppm) alchilici ossigenati (3.0-5.0 ppm), protoni alchilici in prossimità di funzioni elettronegative (2.0-3.0 ppm) e protoni alifatici (0.50-2.0 ppm). Anche in questo caso, come per l'esperimento CP-MAS osserviamo una netta preponderanza di materiale alifatico. Questa differenza nello spettro protonico è resa ancora più evidente rispetto allo spettro CP-MAS del nuclide  $^{13}\text{C}$  per via del rilassamento più rapido degli idrogeni meno schermati (nella parte sinistra dello spettro) che ne

riduce l'intensità, e per una maggiore abbondanza di protoni a parità di atomi di carbonio nelle sostanze a minore indice di insaturazione, come appunto le catene alifatiche.

Sebbene alcuni segnali siano abbastanza definiti da intuirne la molteplicità (**Figura 5.13**), la caratterizzazione del campione dall'osservazione di questo spettro non è praticabile. Il problema principale che si pone quando si analizzano le HS in NMR è il fatto che non si ha a che fare con un'unica sostanza. Questo genera sovrapposizione dei segnali che può indurre ad un'assegnazione errata degli stessi. Altre difficoltà vengono da fenomeni di aggregazione, che risultano in diffusione di spin, abbattendo l'intensità dei segnali. Inoltre, la tecnica NMR non ha una sensibilità elevata, non si adatta quindi all'analisi delle componenti in tracce.

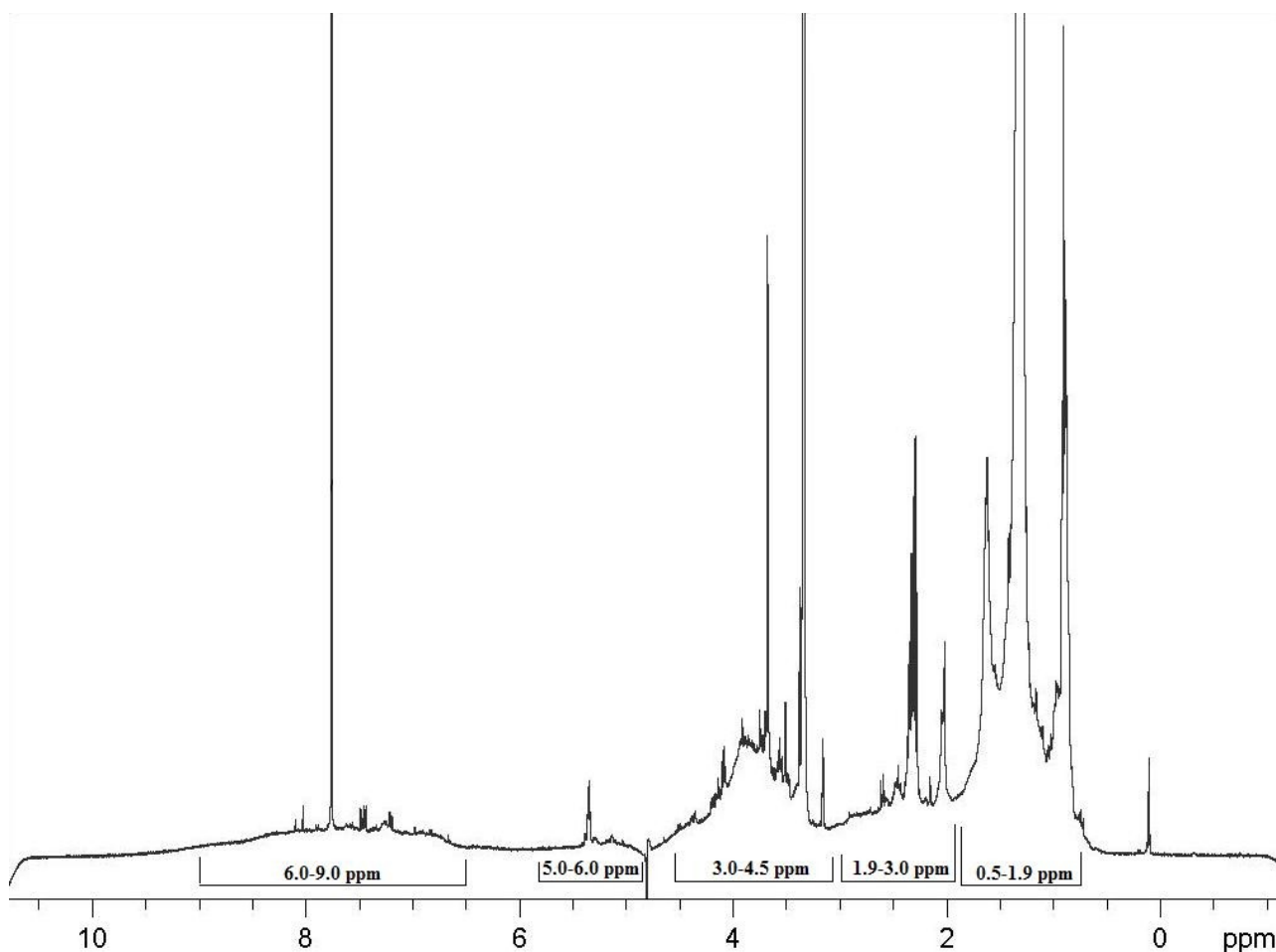
Lo spettro in Figura 5.13 alcuni picchi piuttosto caratteristici che meritano un discorso a parte. Il singoletto nella zona aromatica a 7.75 ppm è piuttosto comune quando si analizzano soluzioni di HS, è ipotizzabile che sia dovuto a una funzione estere formica originatasi da una parziale degradazione di gruppi metossili che sono successivamente ulteriormente ossidati ad anidride carbonica. Altri segnali minori si intravedono nella zona aromatica (7.0-9.0 ppm), la cui intensità li distingue dal rumore di fondo. Quest'ultimo sembrerebbe essere una costante quando si analizzano campioni unici, segno che questi protoni sono soggetti a fenomeni di rilassamento rilevanti. Nella zona olefinica si distingue un segnale intorno a 5.30 ppm. Questo valore è abbastanza comune per i protoni legati a carboni con ibridazione  $sp^2$ . Appare abbastanza evidente che questo picco sia attribuibile agli acidi insaturi precedentemente riscontrati in GC-MS per questo stesso materiale **ORG1**.

La zona alchilica ossigenata (3.0-5.0 ppm) è piuttosto confusa e presenta, come la regione aromatica, un segnale piuttosto largo e indefinito. Da questo segnale tuttavia si distinguono alcuni singoletti. Essi sono più sottili e più facilmente individuabili nello spettro per la loro intensità. Questi protoni sono probabilmente esteri/eteri metilici (aromatici o alifatici), oppure O-metil carboidrati.

La regione alchilica propone due segnali caratteristici intorno a 2.00 e 2.30 ppm, oltre a numerosi picchi meno intensi e definiti. Questi segnali, a differenza degli altri finora presi in considerazione, non risuonano come singoletti. I valori di spostamento chimico sono piuttosto inequivocabili, essi sono assegnabili ai metileni adiacenti rispettivamente a un doppio legame (2.00 ppm) e a un gruppo carbossilico di un acido grasso (2.30 ppm). Il primo è molto importante essendo l'unico segnale che differenzia lo spettro di un acido grasso da quello di un alcano. Queste due categorie sono entrambe rappresentate nel campione **ORG1**, alla luce ai dati di GC-MS discussi in precedenza.

Per caratterizzare in modo più accurato la sostanza organica, esperimenti monodimensionali non sono sufficienti, è necessario l'utilizzo delle più potenti tecniche bidimensionali.

**Figura 5.13:** Spettro H-NMR monodimensionale in CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> 1:1 di ORG1 (ppm)



### 5.5.3 ORG1 Spettroscopia bidimensionale in soluzione omo-ed eterocorrelata

Gli esperimenti bidimensionali rivelano correlazioni tra nuclidi in reciproca prossimità. A seconda che si tratti di correlazione tra atomi dello stesso tipo o diversi, si parla di omo- o etero-correlazione. Gli esperimenti di correlazione possono essere impostati per evidenziare interazioni tra atomi separati da un numero variabile di legami, raramente oltre i cinque. Fino a tre legami si tratta di accoppiamento a breve raggio (*short range*), oltre i tre legami si tratta di accoppiamento a lungo raggio (*long range*). Esperimenti di COSY e HSQC rivelano accoppiamenti a breve raggio, rispettivamente omo-(H-H) ed etero-(H-C) correlati. Esperimenti di TOCSY e HMBC rivelano accoppiamenti a lungo raggio, anch'essi rispettivamente omo- ed eterocorrelati.

L'attribuzione dei segnali comincia con l'assegnazione quanto più ragionevole possibile delle eterocorrelazioni *short range*, per definire dei blocchi di molecole che poi sono associati tra loro con l'analisi delle omocorrelazioni *short range*. Le correlazioni a lungo raggio completano la “costruzione” delle strutture, attraverso la definizione dei sistemi di spin, ossia gruppi di segnali a due a due correlati, interrotti da carboni quaternari, e il collegamento tra questi sistemi di spin attraverso le correlazioni *long range* tra un carbonio quaternario e un protone abbastanza vicino.

Una difficoltà che si incontra è l'attribuzione non univoca a causa dell'eterogeneità del campione. Ci possono infatti essere sovrapposizioni di segnali appartenenti a molecole diverse che impedisce una caratterizzazione esaustiva delle sostanze umiche analizzate.

Il campione **ORG1** è caratterizzato da un numero piuttosto rilevante di correlazioni. Analizzando gli spettri, possiamo definire molti sistemi di spin, o almeno riconoscere alcuni segnali che potrebbero appartenere a strutture note dalla MS.

Gli spettri COSY, HSQC, TOCSY e HMBC sono raffigurati nelle **Figure 5.14a-d** e i loro *cross peaks* sono riassunti nella **Tabella 5.5**.

Lo spettro COSY mostra un'unica correlazione nella zona aromatica (6.0-9.0 ppm), una correlazione nella zona alchilica ossigenata (3.0-4.0) e svariate correlazioni tra protoni risuonanti

nella regione alchilica (0.50-2.00 ppm), inoltre si osservano diverse correlazioni tra protoni alifatici con alifatici ossigenati.

Lo spettro HSQC raffigura in prevalenza interazioni scontate tra protoni e carboni chiaramente della stessa categoria spettrale, per la maggior parte nella regione alifatica (10-40 ppm).

L'esperimento TOCSY, che è rilevante solo per quelle interazioni assenti nel COSY, assegna sistemi di spin in cui sono coinvolti protoni alifatici (0.5-2.0 ppm) e olefinici (5.30 ppm) e tra alifatici e alchilici ossigenati (3.0-5.0 ppm).

Infine lo spettro HMBC evidenzia correlazioni tra carboni alcolici secondari (70-75 ppm), e protoni aromatici (7.50-8.10 ppm), tra carboni aromatici (130-150 ppm) e protoni alifatici (1.25 ppm) e tra carboni alifatici (<40 ppm) e protoni alifatici (0.75-2.00 ppm)

In base a questi dati possiamo delineare alcuni sistemi di spin e alcune correlazioni.

Il sistema di spin che coinvolge il gruppo olefinico è attribuibile a una catena insatura lineare, infatti il protone olefinico (5.30 ppm) correla con il protone adiacente (2.00 ppm) che a sua volta sente l'interazione di un segnale metilenico alifatico (1.25 ppm). La correlazione TOCSY tra il primo e il terzo, in ordine, conferma il dato in modo inequivocabile.

La correlazione COSY tra due protoni idrossi alchilici (4.00-5.00 ppm) evidenzia la presenza di sostanze con ossidrili vicinali.

Il sistema di spin che coinvolge un protone alchilico ossigenato (3.00-4.00 ppm), un protone alchilico ad esso adiacente e per questo leggermente deschermato dall'ossigeno (1.50 ppm) e un segnale alifatico metilenico costituiscono un sistema di spin, confermato, come in precedenza nel caso del doppio legame, dalla correlazione TOCSY tra il primo e il terzo nell'ordine elencato. Questo sistema può essere attribuito a un alcol alifatico a lunga catena o a un acido grasso idrossilato.

Con lo stesso metodo appena proposto, assegnamo anche il sistema attribuibile al terminale carbossilico di un acido grasso, comprendente il protone adiacente alla funzione acida (2.30 ppm) il protone successivo (1.65 ppm) e il successivo metilene alifatico, troppo distante perchè si verifichi spostamento dal valore consueto (1.25 ppm).

L'estremità non funzionalizzata di una catena alchilica è caratterizzata dall'interazione tra metile terminale (0.75 ppm) e metilene alchilico (1.25 ppm) visibile in COSY e TOCSY.

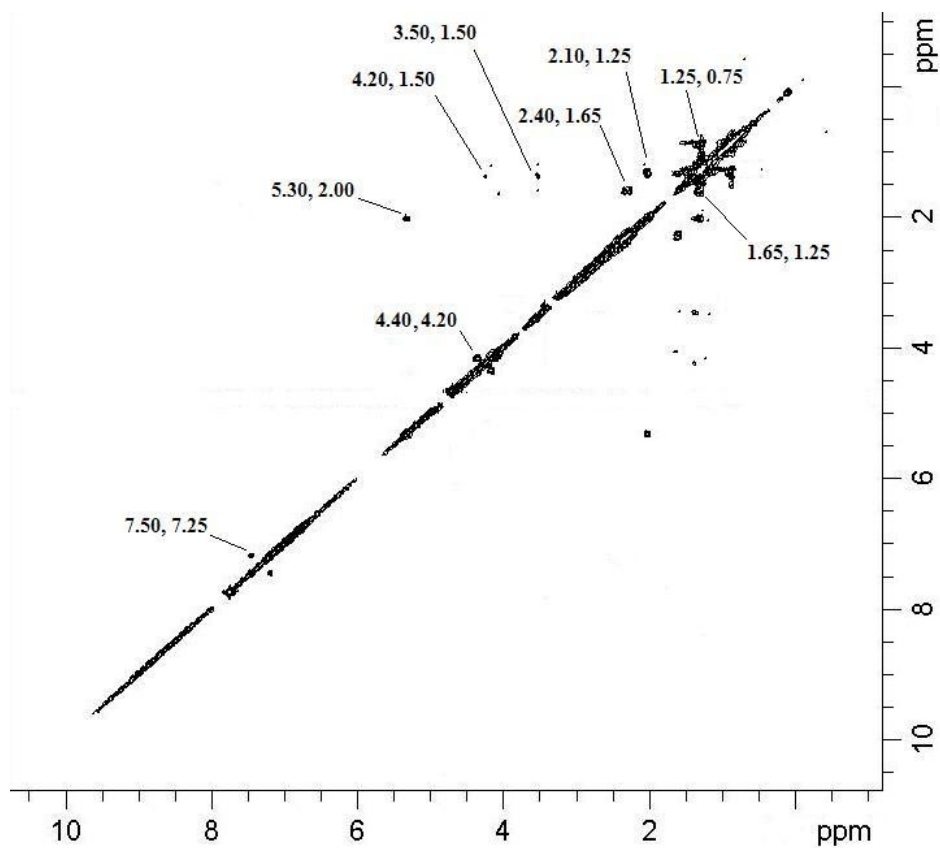
Infine, sono riconoscibili nello spettro HMBC le insolite correlazioni tra carboni aromatici intorno a 140 ppm e protoni alifatici intorno a 1.25 ppm. Esse indicano un sostituito alifatico su un anello aromatico, e l'unico composto che può corrispondere a queste caratteristiche, tra quelli che sono stati evidenziati in GC-MS risulta essere l'acido deidroabietico, che avendo una struttura policiclica ha anche una tendenza a formare correlazioni long range dette “w” in base alla forma in cui si trovano bloccati i legami coinvolti nelle strutture a “sedia”.

Uno schema riassuntivo di queste assegnazioni è proposto nella **Figura 5.15**.

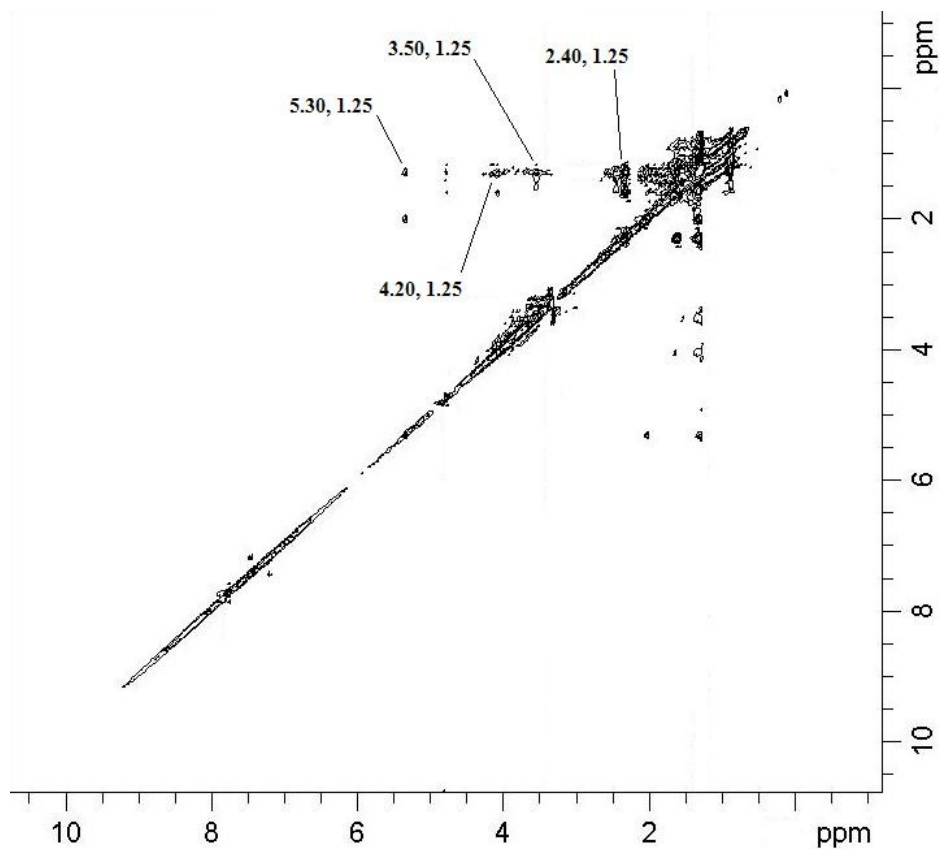
Gli esperimenti bidimensionali rispetto al monodimensionale hanno approfondito alcune strutture caratteristiche (**Figura 5.15**). Tali sistemi di spin sono pienamente in accordo con i dati qualitativi emersi dagli esperimenti di MS, e pertanto ne consolidano la validità.

**Figure 5.14a-d:** Spettri NMR bidimensionali in  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$  1:1 di ORG1 (ppm)

**Figura 5.14 a:** H-H COSY

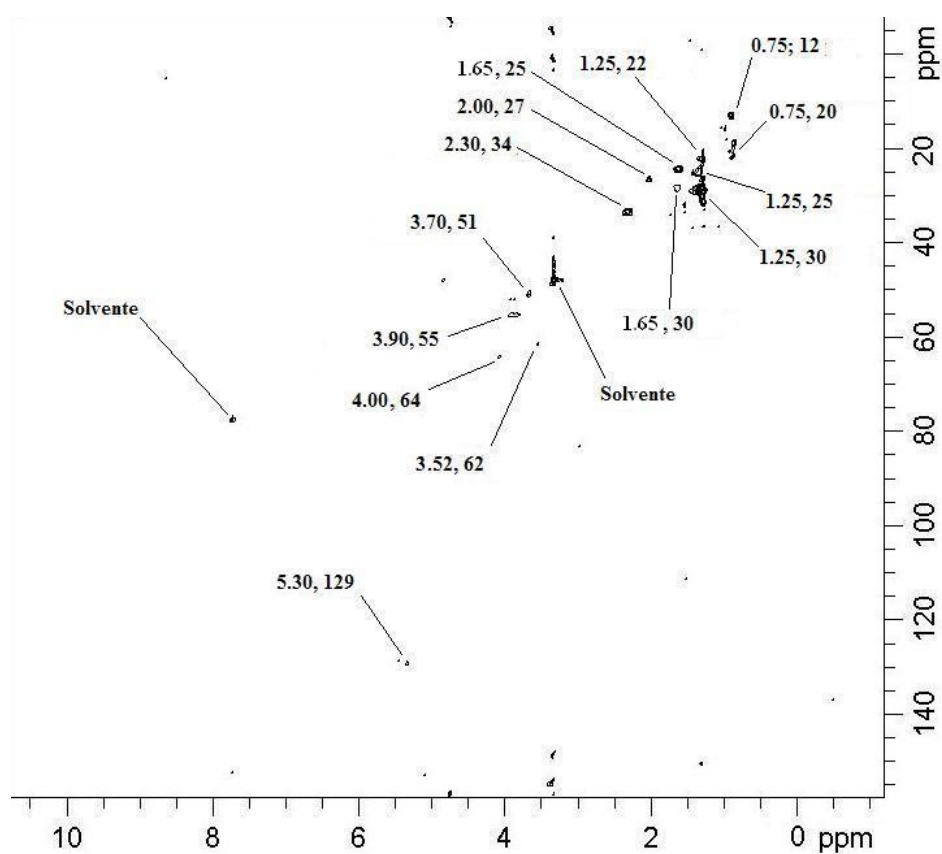


**Figura 5.14b:** H-H TOCSY

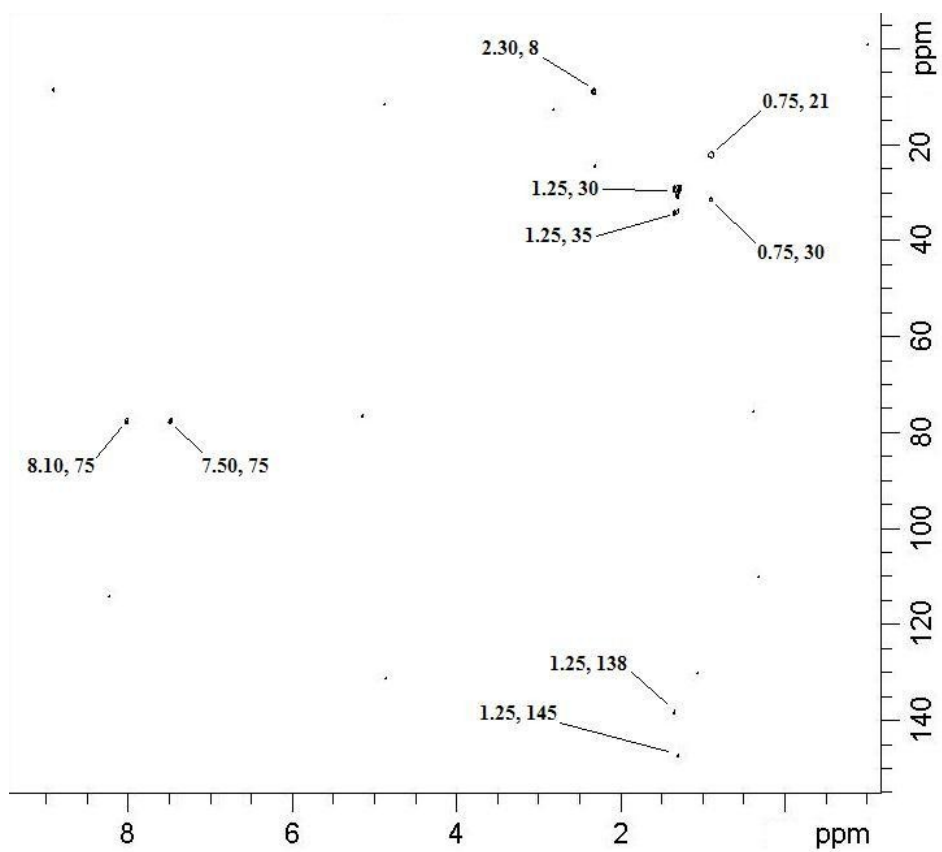




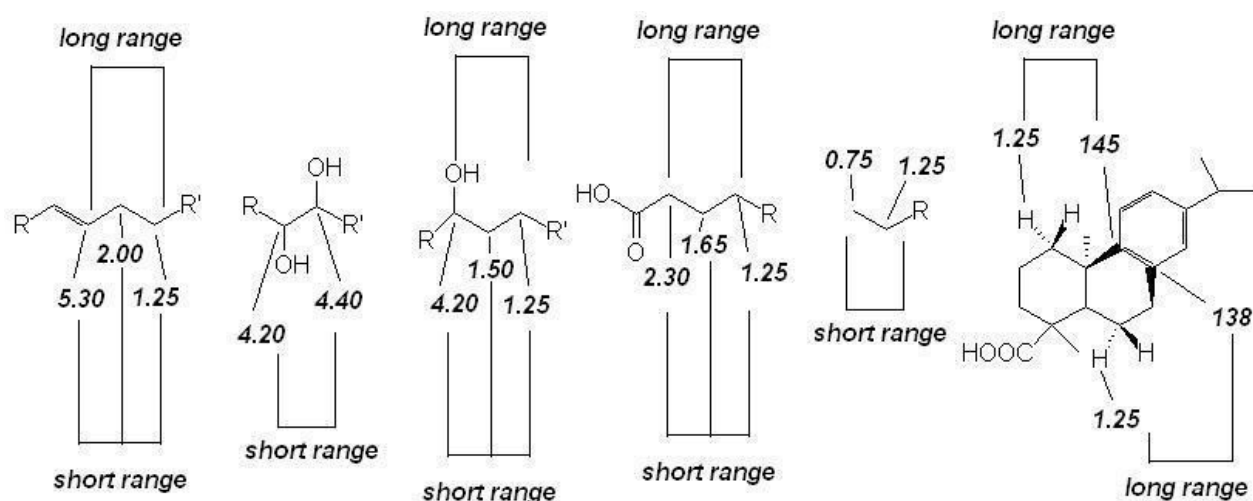
**Figura 5.14c: H-C HSQC**



**Figura 5.14d: H-C HMBC**



**Figura 5.15:** Schema riassuntivo di alcuni sistemi di spin (ppm) in ORG1



**Tabella 5.5:** Elenco delle principali correlazioni NMR in spettri bidimensionali ORG1

**F1=<sup>13</sup>C F2=<sup>1</sup>H (ppm)**

$J_{H-C}^1$	$J_{H-C}^{long\ range}$	$J_{H-H}^{2-3}$	$J_{H-H}^{long\ range}$
F2, F1	F2, F1 (ppm)	F2, F1 (ppm)	F2, F1 (ppm)
5.30, 129	8.10, 75	7.50, 7.25	5.30, 1.25
4.00, 64	7.50, 75	5.30, 2.00	4.20, 1.25
3.90, 55	2.30, 8	4.40, 4.20	3.50, 1.25
3.70, 51	1.25, 145	4.20, 1.50	2.40, 1.25
2.30, 34	1.25, 138	3.50, 1.50	
2.00, 27	1.25, 35	2.40, 1.65	
1.65, 30	1.25, 30	2.10, 1.25	
1.65, 25	0.75, 30	1.65, 1.25	
1.25, 30	0.75, 21	1.25, 0.75	
1.25, 25			
1.25, 22			
0.75, 20			
0.75, 12			

## 5.6 Analisi MS di componenti debolmente legate alla matrice organosolubili (**ORG2**) e idrosolubili (**ACQ2**)

La componente debolmente legata è costituita dalle molecole legate strutturalmente alla matrice unica con legami esteri labili, idrolizzabili per effetto di un acido di Lewis come il  $\text{BF}_3$ . Tale legame è retaggio dei poliesteri di origine vegetale i cui prodotti di degradazione incompleta sono presenti nelle HS (Kolattukudy *et al.*, 1975). L'impiego di metanolo come solvente comporta che i carbossili esterei risultino metilati dopo la reazione. L'estratto metanolico, dibattuto in un sistema acqua/cloroformio, si ripartisce in una parte apolare (**ORG2**) e una polare (**ACQ2**).

L'estratto **ORG2** è stato analizzato previa derivatizzazione delle funzioni più polari come ossidrili e carbossili, le quali formano derivati metilici e trimetilsililici. Le aree dei picchi del cromatogramma sono state confrontate con standard esterni per quantificare ciascuna componente. Come accaduto per l'estratto organico dei componenti liberi discusso nel capitolo precedente, il campione è stato separato in due frazioni a polarità differente mediante trattamento SPE su silice a fase diretta. Sono state inoltre sperimentate diverse condizioni di reazione al fine di ottimizzare il processo di derivatizzazione. Sono state stimate le rese dell'analisi delle componenti per confronto con il materiale iniettato. Sono stati valutati gli effetti sulle misure delle diverse condizioni di derivatizzazione sperimentate e della separazione SPE.

La fase acquosa, opportunamente preparata, è stata analizzata per HPSEC-ESI-Orbitrap-MS come descritto per l'HA di partenza. La tecnica rivela i composti ionizzabili presenti nel campione e ne fornisce la formula bruta. Da queste informazioni scaturiscono alcune considerazioni sulla composizione e sul contenuto di azoto della frazione **ACQ2**. Le rese quantitative per l'analisi sono state valutate per confronto tra risposta quantitativa delle sostanze in analisi e peso della frazione

## 5.7 Analisi MS di componenti organosolubili debolmente legate alla matrice (ORG2)

### 5.7.1 ORG2: Analisi GC-MS, Aspetti qualitativi

Come la componente libera, anche la componente debolmente legata è composta principalmente da acidi grassi saturi, a struttura lineare o ramificata, acidi insaturi, acidi idrossilati,  $\alpha,\omega$  diacidi, alcoli lineari a lunga catena, idrocarburi, acidi aromatici, aminoacidi, steroli, e sostanze poliossidrilate come i carboidrati. Non sono stati trovati invece acido deidroabietico o alanina.

I risultati sono riassunti nella **Tabella 5.6**. Per questa frazione sono stati valutati gli effetti sull'analisi della separazione SPE su silice, come per la componente libera, e sono stati confrontati metodi di sililazione **sil** e **pyr**. Nel precedente capitolo si è visto come le condizioni di derivatizzazione potessero influenzare la rivelabilità dei composti in termini quali-quantitativi.

Anche per questa frazione si riscontrano acidi grassi saturi lineari. Il metodo **sil** (sililazione in assenza di cosolventi e successiva solvatazione con diclorometano per GC) ha prodotto i risultati più soddisfacenti per questa classe di composti, evidenziando strutture da quattordici a ventiquattro carboni. L'utilizzo della procedura **pyr** (sililazione in soluzione di piridina e iniezione della stessa in GC) si è rivelata deludente, registrando solo i due acidi più abbondanti ossia a 16 e 18 termini. I composti sono prevalentemente metilati, per effetto della reazione di *cleavage*, tuttavia per il metodo **pyr** essi si presentano come sililesteri. Le condizioni di reazione potrebbero quindi aver causato una distruzione dei derivati metilici. Gli acidi grassi tendono ad eluire prevalentemente nella prima frazione SPE (**lip**), dal carattere più lipofilo. Sono stati riscontrati inoltre dei composti a numero dispari di atomi di carbonio, che la frammentazione ci ha permesso di identificare come acidi ramificati in posizione iso e anteiso, di origine batterica (Kaneda, 1991). Essi sono eluiti con la frazione **lip**, e sono assenti nei cromatogrammi seguiti a derivatizzazione **pyr**. Si evidenziano così isomeri iso e anteiso a quindici e diciassette termini e un inusuale composto iso a ventidue atomi di carbonio.

Gli acidi grassi idrossilati, come visto anche nel capitolo precedente, sono meglio evidenziati dopo sililazione in **pyr**. Si riscontrano analoghi dai 9 ai 18 atomi di carbonio, con ossidrilazione in posizione  $\beta$  o  $\omega$  rispetto al carbossile (sempre metilato), e un derivato 10, 14 diidrossiesanoico, che sembra fungere da cross-linker per il poliestere precursore. L'uso del solo sililante ha prodotto come unico risultato un acido metossilato, per comodità associato a questa classe, ma che, a differenza degli altri, non necessita di derivatizzare alcun ossidrile per essere volatilizzato. Questa classe è più abbondante nell'eluato lipofilo (**lip**) ed è avvantaggiata dalla derivatizzazione in piridina.

I composti insaturi, derivatizzati come esteri metilici sono molto poco rappresentati in questo materiale. E' stato riscontrato il solo acido oleico nell'eluato lipofilo, visibile unicamente con derivatizzazione **sil**.

Alcoli lineari sono analizzati come trimetilsililesteri, e, presenti a lunghezza variabile tra dodici e venti termini, sono analizzabili unicamente con derivatizzazione **pyr**. Questo dato conferma la tendenza della piridina ad esaltare le sostanze ossidrilate grazie all'effetto di catalisi basica che favorisce l'evoluzione degli intermedi ossonio. Queste sostanze si accumulano nella frazione SPE lipofila.

Gli acidi difunzionalizzati, sono tra i composti che più si sottraggono alla tecnica GC-MS per scarsa risposta strumentale, e sono prevalentemente accumulati nella frazione **lip**. Sono stati rivelati per sililazione **sil** gli omologhi a nove e diciotto termini come metilesteri, con risposta modesta, e, per sililazione **pyr**, quelli a sei termini con derivatizzazione TMS, con buona risposta. Le tecniche **sil** e **pyr** confermano i limiti per l'analisi di queste sostanze, e questi dati suggeriscono che un meccanismo di idrolisi degli esteri metilici potrebbe instaurarsi durante la reazione in piridina.

Contrariamente a quanto riportato nel capitolo precedente, gli idrocarburi (alcani/alcheni) non derivatizzabili, sono caratterizzati con entrambe le strategie **sil** e **pyr**. Tuttavia, questo materiale

è un prodotto di solvolisi, che ha evidentemente liberato queste sostanze e le ha rese disponibili. L'eluizione SPE, contrariamente a quanto riportato per **ORG1**, segue la scala di polarità, e perciò questi composti sono più abbondanti nella frazione lipofila. Anche questo dato, apparentemente in controtendenza, è in realtà dovuto alla lisi dei legami esterei con estrazione della componente debolmente legata, che libera parzialmente gli idrocarburi intrappolati nella matrice. La differenza è che in questo passaggio di frazionamento la reazione di lisi avviene a livello dell'estrazione. I composti sono qualitativamente più vari con sililazione semplice.

Gli acidi aromatici, derivatizzati sul carbossile come metilesteri o sililesteri e sugli ossidrilici come sililesteri, sono eluiti nella frazione lipofila. La risposta migliore per queste sostanze si ottiene con metodo **pyr**, che evidenzia quattro diverse strutture, con un numero variabile di sostituenti ossidrilici e metossilici. I composti riscontrati, presentano le seguenti sostituzioni: 4-idrossibenzoico; 3-idrossi, 4-metossibenzoico; 3,4 diidrossibenzoico e 4-idrossi, 3,5-dimetossibenzoico. Queste sostanze sono derivati della degradazione della lignina e sono state liberate dalla matrice a seguito di scissione dei legami estere labili. Non sono stati trovati derivati ftalici o cinnamici.

Le sostanze poliossidrilate sono analizzate come sililderivati. Come anche nel precedente capitolo, si registra una netta superiorità del metodo **pyr** nell'analisi di queste sostanze, che risultano poco disponibili ad attacco chimico in un ambiente lipofilo come il solo sililante. Un unico composto è rivelato con questa strategia, e ha struttura disaccaridica. Il legame è evidentemente scisso in condizioni **pyr**. Questo dato conferma ulteriormente che il co-solvente ha un effetto idrolitico intrinseco che facilita la rivelabilità di queste sostanze. Le sostanze analizzate hanno un tempo di ritenzione medio più basso rispetto alla stessa classe di composti in **ORG1**. Una parte di essi è evidentemente stata estratta dalla fase acquosa nella procedura di lavorazione dell'estratto di reazione. Queste sostanze sono generalmente accumulate nella frazione SPE **hyd**.

L'utilizzo della SPE su silice in questo caso ha prodotto risultati non migliori rispetto alla più diffusa aminopropilica (Gutierrez *et al.*, 1998; Fiorentino *et al.*, 2006). Il dato anomalo che si registra è che la silice funzionalizzata con amminopropile produce una perdita di sostanza per adsorbimento irreversibile sulla fase stazionaria, apprezzabile anche a livello cromatico, mentre ciò non accade per i supporti in sola SiO<sub>2</sub>, benché la risposta strumentale risulta inferiore. E' possibile che i risultati con SiO<sub>2</sub> siano però influenzato da tracce di silice disciolta nel metanolo di eluizione, la quale adsorbirebbe i composti e ne ostacolerebbe la derivatizzazione e la volatilizzazione. La preparazione degli addotti TMS con il co-solvente piridina ha invece prodotto il miglioramento più apprezzabile in termini qualitativi per i composti idrofili.

**Tabella 5.6: Principali categorie di composti costituenti l'estratto ORG2 associati alla frazione SPE di eluizione preferenziale e le migliori condizioni di derivatizzazione riscontrate**

Categoria	Ac. lineari	Ac. ramificati	Ac insaturi	Ac idrossilati	Alcoli	Poliidrossilati	Ac. aromatici	Idrocarburi	Diacidi
SPE	lip	lip	lip	lip	lip	hyd	lip	lip	lip
Sililante	sil	sil	sil	pyr	pyr	pyr	pyr	pyr	pyr

**Legenda:**

**SPE:** Frazione SPE con maggior quantità di composto

**Sililante:** Condizioni di sililazione ottimali

**sil:** Reagente sililante

**pyr:** Piridina con 3% sililante

**lip:** Frazione lipofila (3:1 cloroformio:metanolo)

**hyd:** Frazione idrofila (1:3 cloroformio:metanolo)

### 5.7.2 ORG2: Analisi GC-MS, Aspetti quantitativi

Gli acidi lineari più abbondanti in tutte le condizioni di derivatizzazione sono a sedici e diciotto atomi di carbonio, mentre gli altri sono meno abbondanti e mostrano una distribuzione simil-gaussiana. Il contributo maggiore per gli acidi ramificati è l'acido pentadecanoico, più rappresentato nella forma iso, mentre l'omologo superiore è più presente come anteiso. Negli acidi insaturi sono molto rappresentati gli acidi oleico e linoleico. Gli acidi idrossilati sono invece più abbondanti e di struttura varia con sostituzioni in posizione  $\beta$  o  $\omega$  o 10, 14. Lo scheletro più

importante è a sedici termini sostituito più frequentemente in posizione terminale o 10, 14 diidrossilato.

La scissione dei legami esterei porta ad una abbondanza di sostanze con ossidrili liberi. I diacidi misurati con questa tecnica meno abbondanti delle altre sostanze a struttura lineare, il più rilevante è l'acido esandioco. Gli acidi aromatici sono tra le sostanze più abbondanti nel campione **ORG2**, grazie soprattutto alla derivatizzazione in piridina che ottimizza la sililazione di queste sostanze. I più abbondanti sono l'acido 3-idrossi, 4-metossi benzoico e l'acido 4-idrossibenzoico. Gli alcoli sono tra le sostanze meno abbondanti in questa frazione, la loro distribuzione ha un massimo corrispondente all'ottadecanolo, con quantità comparabili di omologhi a 16, 20 e 22 termini.

I composti idrocarburici sono i più rappresentati in questo materiale, se analizzato con strategia **sil**. Questo dato può essere interpretato come una diminuzione della compattezza degli aggregati in seguito della derivatizzazione delle altre sostanze che rende disponibili gli idrocarburi. L'alternativa che fa da contraltare a questa ipotesi, implica che la scarsa derivatizzazione della sostanza organica esalta quei composti dotati di volatilità intinseca, come appunto le paraffine. Essi seguono una distribuzione quali-quantitativa piuttosto irregolare. Nei campioni analizzati con metodo **sil**, i più abbondanti sono riscontrati a tempi di ritenzione 13.5 18.7 e 31.3 minuti, e quest'ultimo dato è assimilabile a quanto osservato per la frazione **ORG1**. La strategia **pyr** invece mostra prevalenza di sostanze a tempi di ritenzione 9.5, 27.4, 29.3 minuti. I tempi misurati con le diverse strategie non sono comparabili.

Per le sostanze poli-idrossilate, l'abbondanza calcolata con l'approccio **pyr** le classifica come i composti più abbondanti in assoluto, con una massa totale di 175 µg/g di estratto. A questo risultato contribuiscono principalmente l'acido tartarico e i picchi a 8.8, 13.5, 14.5 e 15.8 minuti, due di questi picchi (8.8 e 15.8, probabilmente ribosio e glucosio) corrispondevano ai materiali più abbondanti anche nel campione **ORG1**. Queste similitudini sembrano conferire una certa validità



alla tecnica di derivatizzazione impiegata per sostanze di difficile derivatizzazione come i composti poliossidrilati, per i quali anche un solo ossidrile libero ne compromette la volatilizzazione.

Questi risultati sono riassunti in maggior dettaglio nella **Tabella 5.7a-b**.

**Tabella 5.7a-b: Risultati GC-MS quantitativi delle componenti principali di ORG2 ( $\mu\text{g/g}$ ) e relative deviazione standard percentuali. Idrocarburi e sostanze poli-idrossilate sono indicate con il loro tempo di ritenzione**

**Tabella 5.7a: Sililazione senza cosolvente (1 replica)**

Ac lineari	$\mu\text{g/g}$	Idrocarburi	$\mu\text{g/g}$
Ac tetradecanoico	4,44	RT 8.5	5,09
Ac esadecanoico	51,64	RT 13.5	6,67
Ac ottadecanoico	17,02	RT 15.2	3,54
Ac eicosanoico	5,75	RT 15.9	2,47
Diacidi		RT 17.0	1,51
Ac nonandioico	8,26	RT 18.2	2,08
Ac ottadecandioico	2,30	RT 18.7	9,66
Ac. ramificati		RT 21.1	5,21
Ac pentadecanoico anteiso	3,07	RT 22.1	3,12
Ac pentadecanoico iso	4,74	RT 23.5	1,48
Ac eptadecanoico anteiso	2,72	RT 25.2	0,71
Ac eptadecanoico anteiso	1,31	RT 25.5	1,46
Ac docosanoico iso	7,61	RT 26.9	2,22
Ac. insaturi		RT 27.4	2,76
Ac oleico	6,02	RT 27.7	1,09
Ac. idrossilati		RT 30.4	2,19
Ac 3 metossitetradecanoico	7,73	RT 31.3	11,02
Ac. aromatici		RT 33.4	2,71
Ac. 4-idrossibenzoico	14,72	Poli-idrossilati	
Ac. 4-idrossi-3-metossibenzoico	16,88	RT 31.6	3,99

**Tabella 5.7b: Sililazione in piridina con 3% sililante (6 repliche)**

Ac lineari	µg/g	dev. st.	Alcoli	µg/g	dev. st.
Ac esadecanoico	43387,57	18,65	Dodecanolo	751,24	21,39
Ac ottadecanoico	56216,00	12,53	Esadecanolo	2372,96	23,36
<b>Diacidi</b>			Ottadecanolo	2843,45	15,20
Ac esandioico	1599,66	21,87	Eicosanolo	2523,06	21,47
Ac insaturi			Docosanolo	2504,82	25,42
Ac linoleico	1080,58	105,00	<b>Idrocarburi</b>		
Ac oleico	1779,38	50,40	RT 9.5	3817,37	21,39
Ac esadecenoico	713,50	22,24	RT 21.0	542,28	89,48
<b>Ac idrossilati</b>			RT 21.1	612,05	42,42
Ac ω-idrossinonanoico	5502,80	25,70	RT 25.3	432,60	116,17
Ac β-idrossidodecanoico	10885,13	23,27	RT 27.4	1177,17	117,97
Ac β-idrossitetradecanoico	14194,48	28,49	RT 29.3	1584,11	140,73
Ac ω-idrossitetradecanoico	2129,66	12,54	<b>Composti poli-idrossilati</b>		
Ac β-idrossipentadecanoico	2327,91	38,44	Ac. tartarico	9393,84	162,70
Ac β-idrossiesadecanoico	10319,91	24,15	3,3-dimetossi-metil-esoside	4203,42	24,42
Ac ω-idrossiesadecanoico	15049,68	26,22	RT 7.9	3551,26	17,04
Ac 10,14-di-idrossiesadecanoico	13754,65	33,67	RT 8.2	4834,86	105,61
Ac β-idrossieptadecanoico	3034,85	26,81	RT 8.4	1970,15	110,21
Ac ω-idrossiottadecanoico	6606,68	21,67	RT 8.8	12865,07	25,42
<b>Ac aromatici</b>			RT 11.7	2310,81	21,64
Ac. 4-idrossibenzoico	39069,86	19,48	RT 13.5	66195,94	105,49
Ac. 3-idrossi-4-metossibenzoico	72119,79	24,68	RT 13.7	1847,43	33,45
Ac. 3,4-di-idrossibenzoico	10083,31	16,70	RT 14.0	2160,07	99,40
Ac. 3,5-dimetossi-4-idrossibenzoico	23485,89	24,31	RT 14.2	5207,68	114,02
			RT 14.5	18018,69	139,47
			RT 15.2	8674,19	108,84
			RT 15.3	5191,87	83,16
			RT 15.8	19578,73	33,06
			RT 16.3	9026,60	62,39

### 5.7.3 ORG2: Analisi GC-MS, Rese del processo di analisi

Le rese dell'analisi quantitativa con i diversi approcci descritti (**sil** e **pyr**), intese come rapporto tra massa complessiva delle sostanze caratterizzate e il peso dell'estratto o dell'acido umico di partenza, sono messe a confronto tra loro per valutare le migliori condizioni di derivatizzazione.

La piridina, con il suo effetto catalitico e di solvatazione moderatamente polare, ha un effetto positivo sulla derivatizzazione delle sostanze nel campione **ORG2**. Questo effetto in termini di resa è notevole. La miscela in questione però sembra influenzare negativamente la risposta delle sostanze prive di funzioni ossidriliche. E' possibile che a questo fenomeno contribuisca un effetto idrolitico nei confronti dei derivati metilesteri. Il meccanismo implicato è alquanto difficile da individuare.

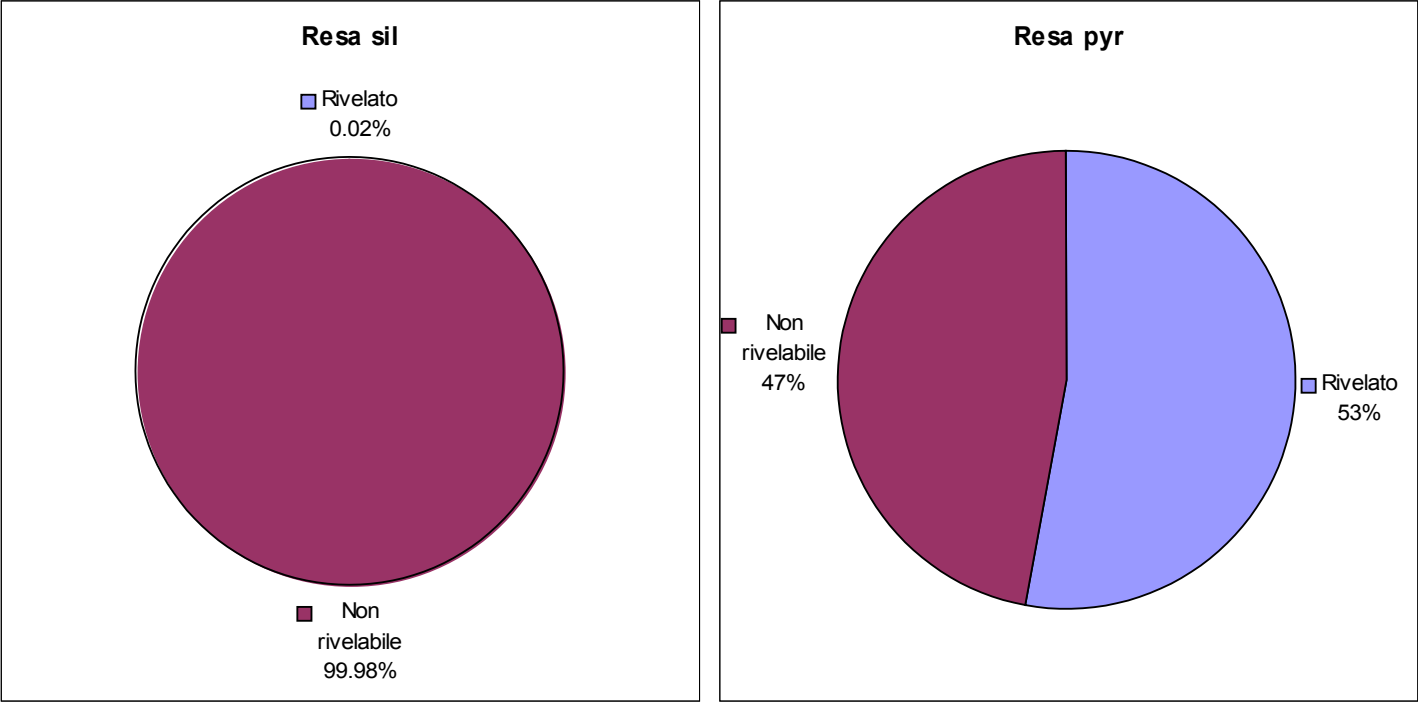
I composti maggiormente coinvolti nel miglioramento analitico dovuto alla **pyr** sono i più idrofili, ossia le sostanze polioidrossilate, e in misura minore ma comunque notevole, gli alcoli, i diacidi, gli acidi idrossilati e gli acidi aromatici. Per sostanze come gli alcani e gli acidi monofunzionali, il metodo da preferire è invece la sililazione in assenza di cosolvente e la diluizione in diclorometano. Tali condizioni permettono di rivelare un maggior numero di composti. Il metodo **pyr** ha invece aumentato la risposta strumentale per gli acidi lineari più rappresentati, benché si osservi un peggioramento in termini qualitativi, poiché le sostanze meno abbondanti appaiono comunque sotto il limite di rivelabilità.

In tutti i casi citati, in alternativa a queste ipotesi, potrebbe giocare un ruolo positivo o negativo la bassa volatilità dei solventi piridina e dmf nella corsa gascromatografica.

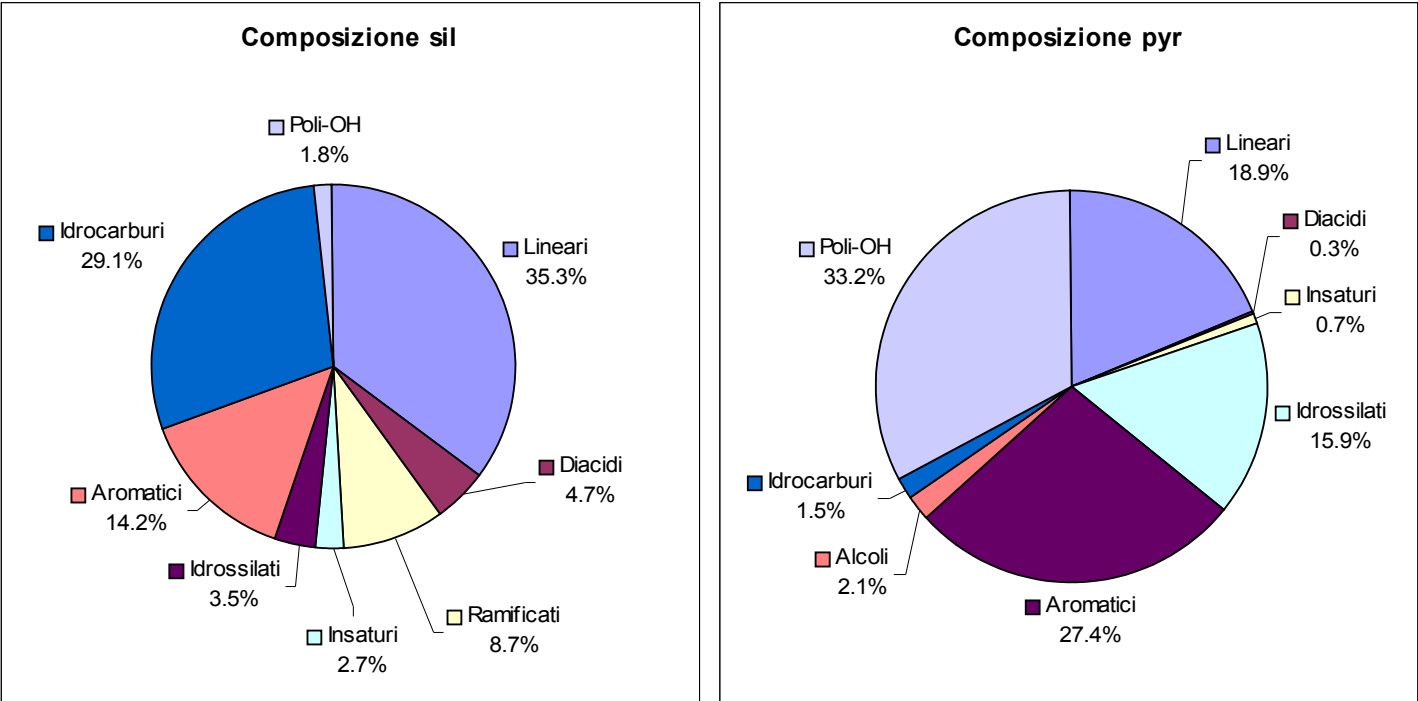
Esaminando la risposta strumentale complessiva del campione rispetto al peso della sostanza organica totale, il metodo **pyr** è di ben tre ordini di grandezza più efficiente del metodo **sil**. La tecnica **pyr** è la più adatta alla caratterizzazione quali-quantitativa delle sostanze idrofile, ed a quella quantitativa delle sostanze lipofile. La strategia **sil** ha come unico vantaggio di individuare meglio la varietà delle sostanze non ossidrilate. Nelle **Figure 5.16a-b** sono mostrate rispettivamente

la resa analitica rispetto al materiale **ORG2** totale e la composizione molecolare relativa alla parte rivelabile.

**Figura 5-16a:** Confronto tra rese (%) del processo analitico rispetto alla quantità totale di ORG2 per i metodi utilizzati



**Figura 5-16b:** Composizione molecolare (%) di ORG2 in riferimento alle categorie molecolari riscontrate nei due diversi metodi analitici



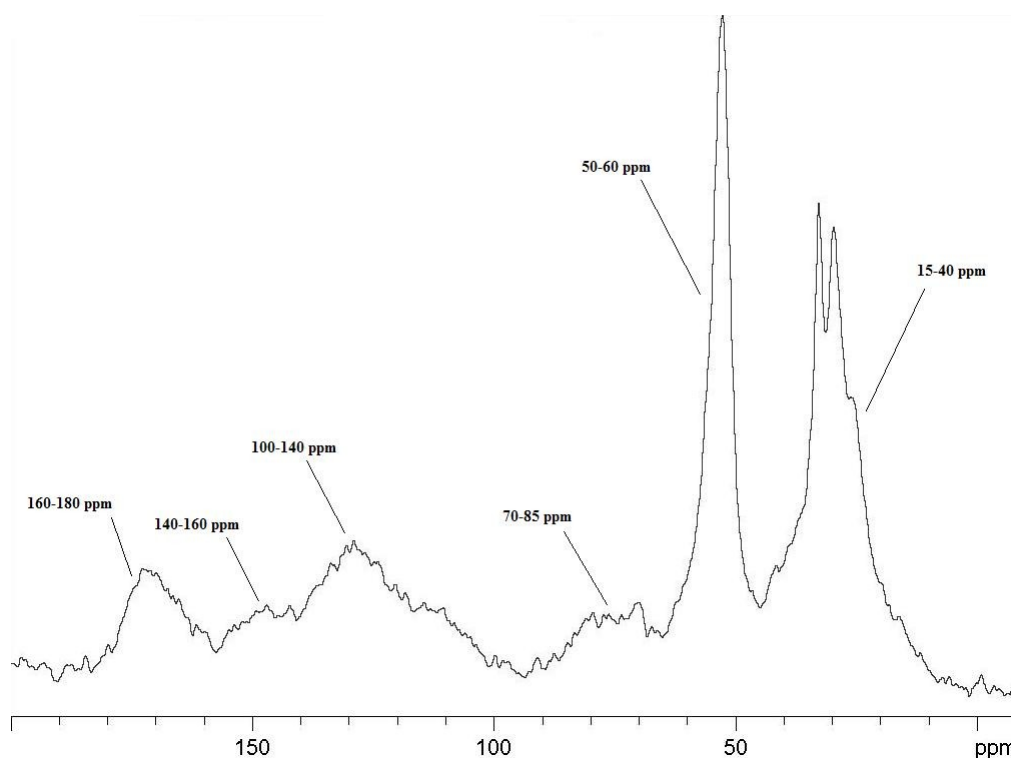
## 5.8 Spettroscopia NMR di componenti organosolubili debolmente legate alla matrice (ORG2)

### 5.8.1 ORG2: Spettroscopia $^{13}\text{C}$ NMR in fase solida

L'analisi dello spettro CP-MAS (**Figura 5.17**) ha evidenziato una regione carbossilica ( $>150$  ppm) una aromatica/olefinica (100-150 ppm) con una spalla intorno a 140-160 ppm, una regione alchilica ossigenata (70-86 ppm) una regione dovuta ai legami metilesteri introdotti con la reazione di scissione del legame estere (60 ppm) e una regione alchilica (15-40 ppm) rappresentata da due picchi parzialmente sovrapposti.

Alla luce di questi dati emerge che il carattere di questa sostanza è meno spiccatamente alchilico rispetto a quanto visto per **ORG1**. I carboni alchilici tuttavia sono ancora la regione preponderante dello spettro. La spalla del picco aromatico è attribuibile a una quantità rilevante di acidi aromatici idrossilati. L'introduzione di gruppi metilici su alcune funzioni acide ha causato uno spostamento dei segnali dei carboni prossimi al legame estereo. La differenza di scheratura rispetto agli stessi carboni in prossimità degli acidi liberi determina il doppio picco nella regione più a destra dello spettro

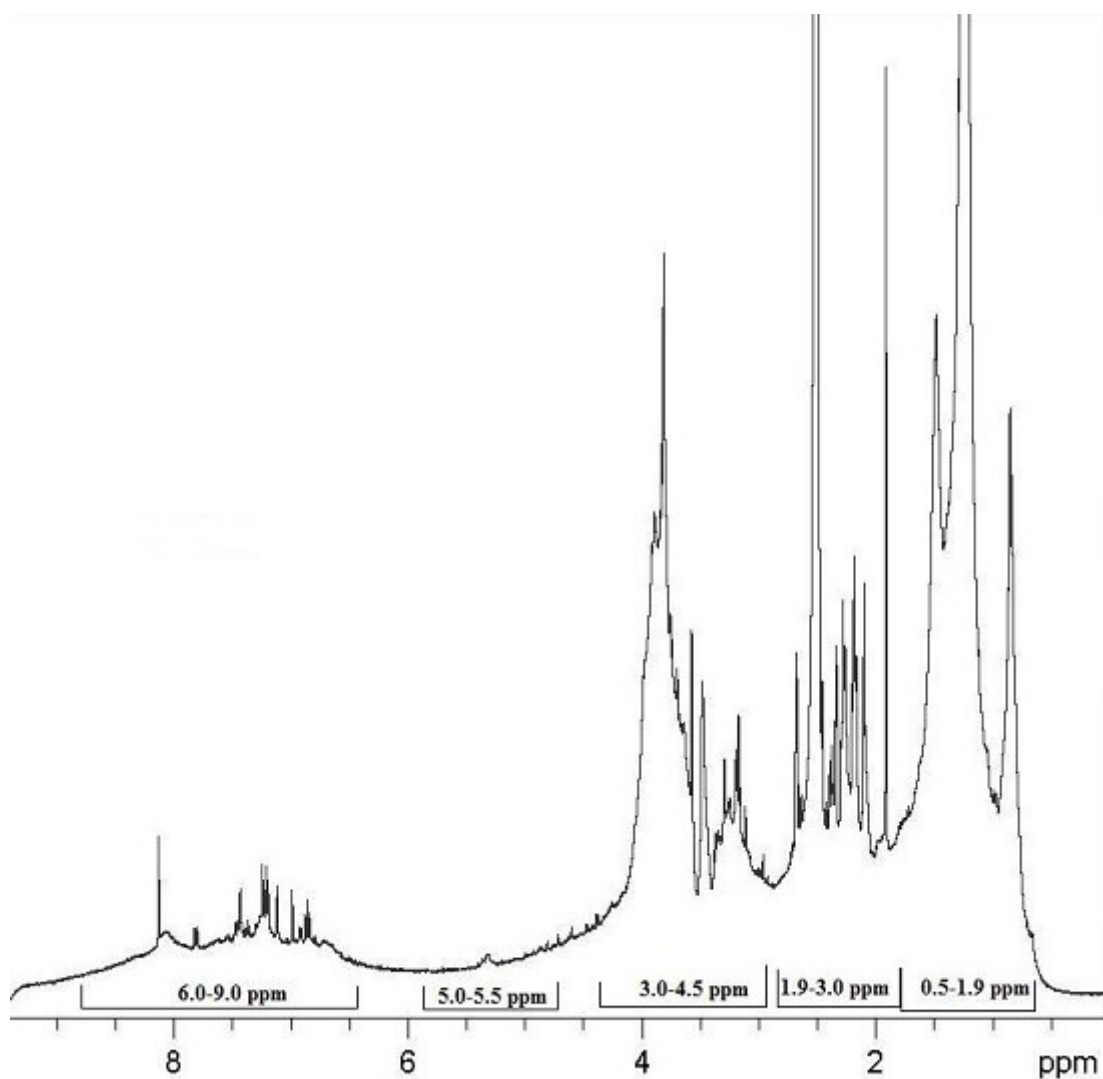
**Figura 5.17:** Spettro  $^{13}\text{C}$  NMR CP-MAS di ORG2 (ppm)



### 5.8.2 ORG2: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione

Il materiale **ORG2** presenta una regione aromatica (6.00-9.00 ppm) larga e indefinita, con alcuni segnali che però emergono dalla moltitudine. La regione olefinica (5.00-6.00 ppm) è meno rappresentata, mentre sono rilevanti gli altri intervalli idrossialchilico (3.00, 4.00 ppm) e alifatico (0.50-2.00 ppm). In quest'ultima si nota una certa abbondanza di segnali adiacenti a carbonili, per effetto della metilazione delle funzioni acide, e quindi variazione nella distribuzione elettronica degli orbitali del carbonile, c'è stato uno *shift* verso campi bassi per alcuni protoni.

**Figura 5.18:** Spettro H-NMR 1D di ORG2 in dmso d<sup>6</sup> (ppm)



### 5.8.3 ORG2: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione

Gli spettri bidimensionali sono illustrati nelle **Figure 5.19a-d** e i picchi riassunti in **Tabella 5.8**.

Lo spettro HSQC di **ORG2** (**Figura 5.19c**) evidenzia correlazioni tra protoni e carboni attribuibili a poche categorie spettrali. La regione aromatica ( $F_2=7.00-8.00$   $F_1=100-140$  ppm) è discretamente definita, mentre più intense e confuse appaiono le regioni alchiliche ossigenate ( $F_2=3.00-4.50$   $F_1=40-70$  ppm) e alifatiche ( $F_2=0.50-2.50$   $F_1=10-40$  ppm).

Lo spettro HMBC (**Figura 5.19d**) invece denota alcune interazioni interessanti tra protoni metossilici (3.00-3.50 ppm) e carboni aromatici (100-150 ppm), che indicano la presenza di residui aromatici derivanti da degradazione della lignina. Altre correlazioni sono presenti tra protoni alchilici (0.50-1.25 ppm) e carboni aromatici (170 ppm) e alchilici (10-40 ppm), attribuibili ad acidi grassi o ai loro esteri metilici.

Le omocorrelazioni COSY e TOCSY (**Figura 5.19a-b**) mostrano un segnale ben definito a livello dei protoni olefinici (5.30 ppm) con il suo caratteristico sistema di spin, e alcune regioni molto dense di picchi. In particolare si registrano numerose correlazioni a breve e lungo raggio tra protoni alchilici (0.50-1.25 ppm), alchilici ossigenati (3.00-4.50 ppm) e all'intersezione tra queste aree. Sufficientemente definita è invece la regione aromatica, con i caratteristici picchi dei derivati idrossibenzoici e idrossimetossibenzoici riscontrati anche in MS.

Nella **Figura 5.19** sono schematizzati i sistemi di spin evidenziati con le correlazioni corrispondenti. Alcune di esse sono presenti anche nella componente libera (**ORG1**).

Il sistema dell'estere metilico, funzione introdotta con la scissione ad opera del trifluoruro di boro, consiste in due sistemi isolati (acilico a 2.30 ppm e alcolico a 3.60 ppm) collegati da un'interazione long range di entrambi con il carbonio carbossilico 170 ppm. Questo sistema non si riscontra nella componente libera (**ORG1**).



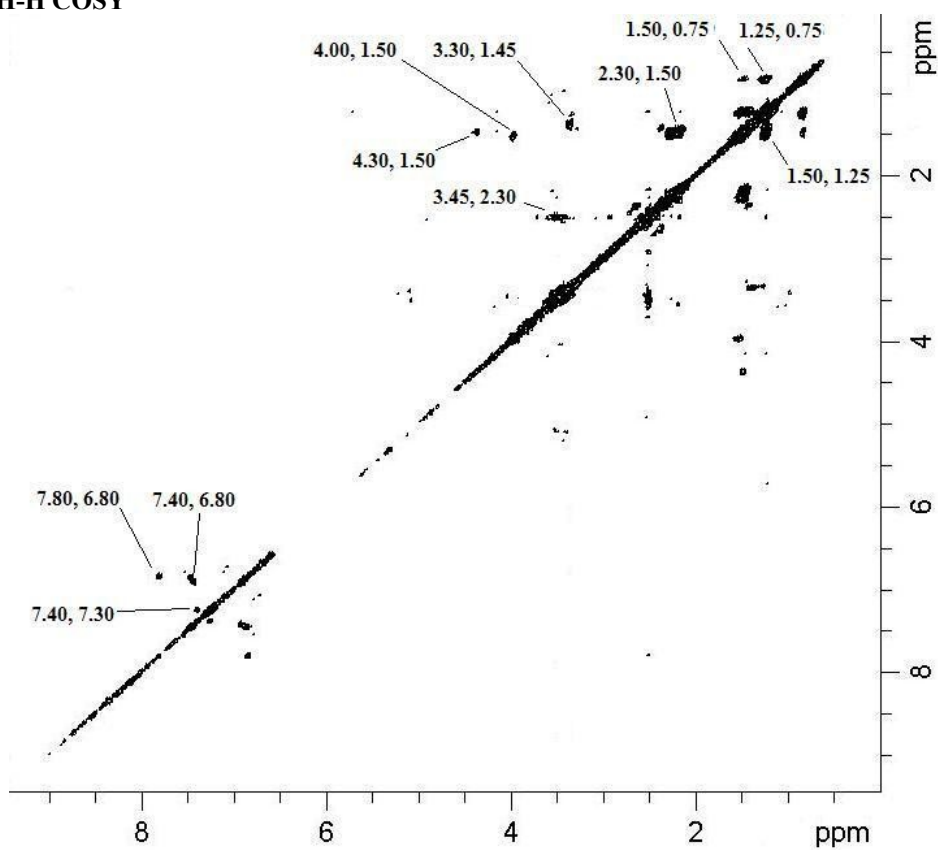
Sono inoltre individuabili gli accoppiamenti tra i protoni degli anelli aromatici (7.40-6.80 e 7.80-6.80 ppm). Le specie metossilate degli acidi aromatici sono presenti insieme agli analoghi ossidrilici. La diversa sostituzione quindi cambia i valori di spostamento chimico dei protoni in posizione *orto*. Il valore più alto (7.60) è attribuibile agli acidi metossibenzoici, quello più basso (7.40) agli acidi idrossibenzoici.

Il sistema alchilico con una ramificazione iso (**Figura 5.19**), è stato definito grazie alla presenza di un'interazione *long range* tra i protoni di un metile e il carbonio di un altro metile (0.75-20 ppm). La presenza di questo *cross-peak* è segno della vicinanza di due metili che si trovano a una distanza tale i protoni di uno si trovano a tre legami dal carbonio dell'altro.

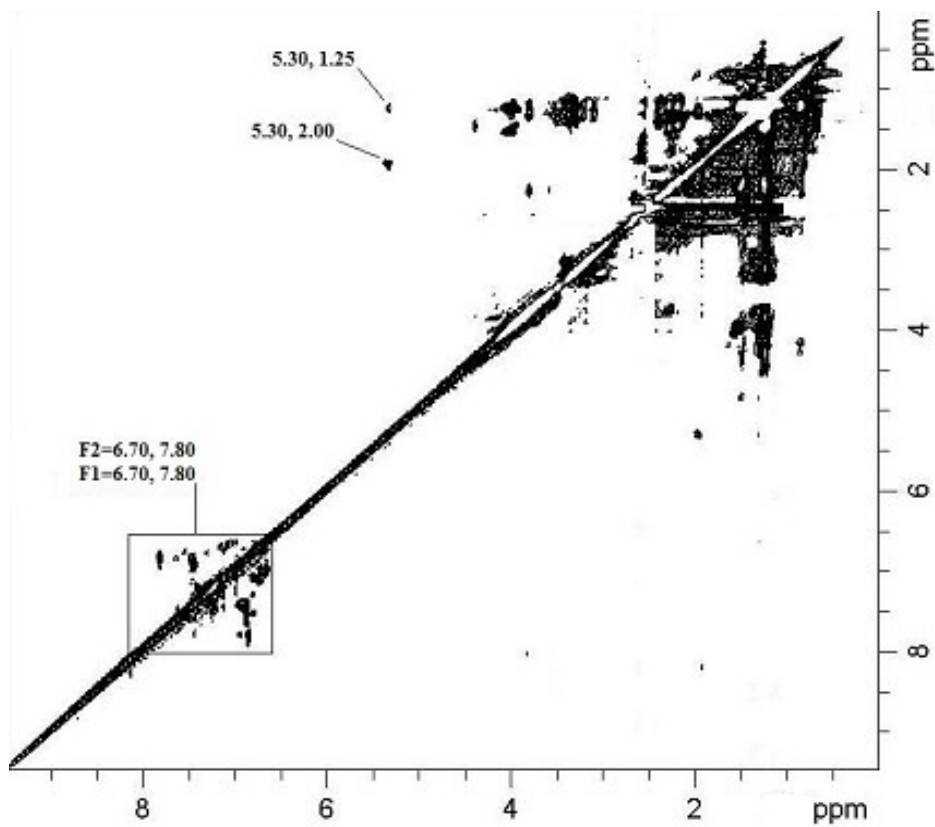
La **Tabella 5.8** riassume le correlazioni riscontrate negli spettri.

**Figure 5.18a-d: Spettri NMR bidimensionali di ORG2 in dms $\text{-d}^6$  (ppm)**

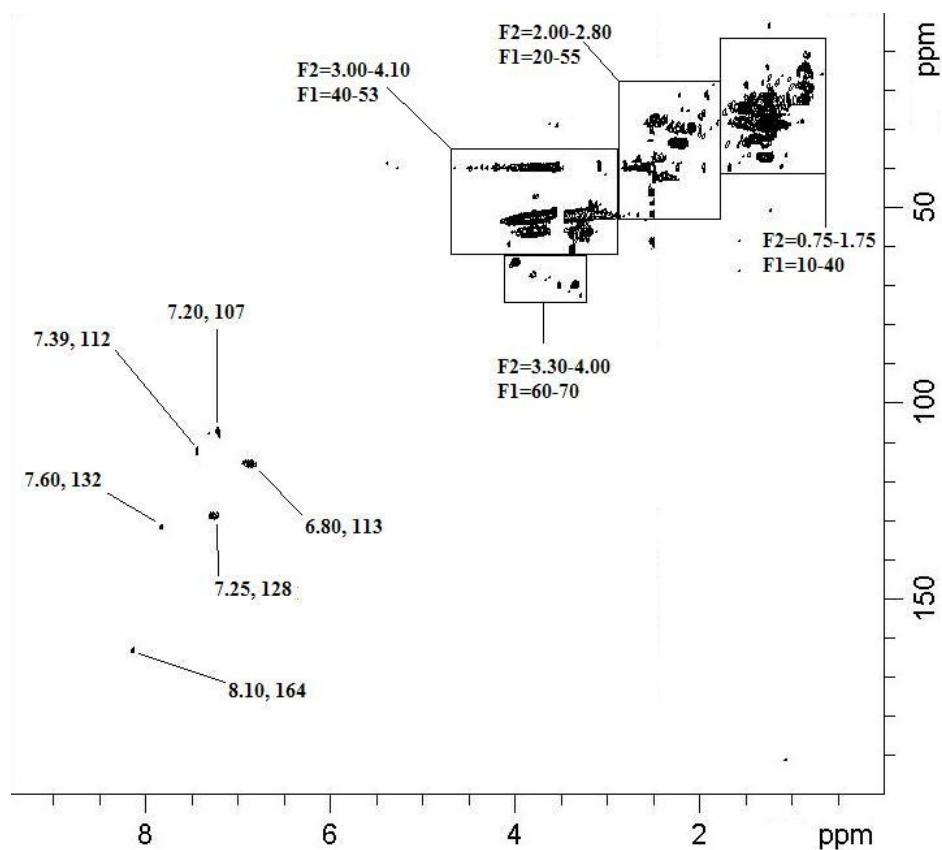
**Figura 5.18a: H-H COSY**



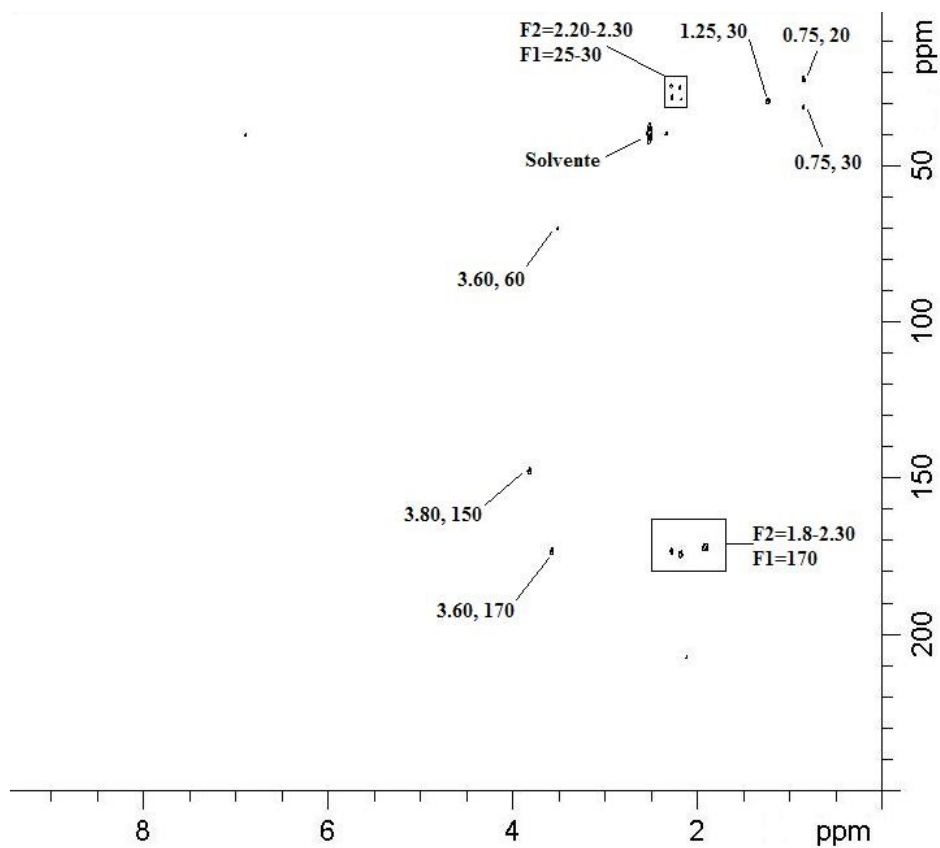
**Figura 5.18b: H-H TOCSY**



**Figura 5.18c: H-C HSQC**

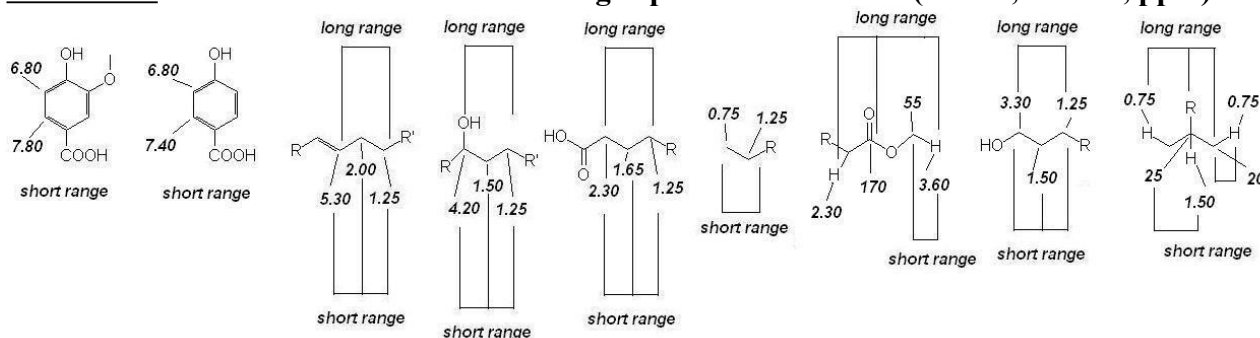


**Figura 5.18 d: H-C HMBC**



**Figura 5.19:** Rappresentazione schematica dei sistemi di spin in base alle correlazioni bidimensionali di ORG2 (ppm)

**Tabella 5.8:** Riassunto delle correlazioni negli spettri 2D di ORG2 (F2=<sup>1</sup>H, F1=<sup>13</sup>C, ppm)



$J_{H-C}^1$	$J_{H-C}^{long\ range}$	$J_{H-H}^{2-3}$	$J_{H-H}^{long\ range}$
F2, F1	F2, F1	F2, F1	F2, F1
8.10, 164	3.80, 150	7.80, 6.80	6.70-7.80, 6.70-7.80
7.60, 132	3.60, 170	7.40, 7.30	5.30, 2.00
7.39, 112	3.60, 60	7.40, 6.80	5.30, 1.25
7.25, 128	2.20-2.30, 25-30	4.30, 1.50	4.00, 1.25
7.20, 107	1.80-2.30, 170	4.00, 1.50	3.30, 1.25
3.30-4.00, 60-70	1.25, 30	3.45, 2.30	2.30, 1.25
3.00-4.10, 40-53	0.75, 30	3.30, 1.45	
2.00-2.80, 20-55	0.75, 20	2.30, 1.50	
0.75-1.75, 10-40		1.50, 1.25	
		1.50, 0.75	
		1.25, 0.75	

## 5.9 Analisi MS di componenti idrosolubili debolmente legate alla matrice (ACQ2)

### 5.9.1 Aspetti generali

La componente debolmente legata è costituita da composti che si liberano dalla matrice in seguito a lisi del legame estere. Una parte di esse ha proprietà che la rendono solubile nei solventi organici, un'altra, invece, ha affinità per le soluzioni acquose, anche a pH non alcalini. Quest'ultima è in genere volatilizzata per pirolisi per via della difficoltà di derivatizzazione che dovrebbe rendere le sue componenti adatte per la GC-MS tradizionale. D'altra parte, lo svantaggio della pirolisi è che non si rivelano le molecole nella loro forma originale, bensì i loro prodotti di decomposizione in assenza di ossigeno.

L'applicazione della tecnica HPSEC-ESI-Orbitrap-MS applicata all'acido umico di partenza ha mostrato una buona risposta, e la stessa tecnica è stata utilizzata per analizzare le sostanze

presenti nella frazione acquosa. In tal modo sono rivelati quei composti presenti in acidi umici e capaci di ionizzarsi negativamente. La tecnica misura la massa dei composti con grande precisione, e questa caratteristica ci consente di risalire alla composizione atomica di un picco e in alcuni casi a delinearne un'ipotetica struttura. Dal confronto delle aree con uno standard interno a concentrazione nota, è possibile ricavare le quantità di ciascuna sostanza nel campione.

#### 5.9.2 ACQ2: Analisi LC-MS, Aspetti qualitativi

Il materiale **ACQ2** è composto principalmente da acidi grassi saturi lineari e ramificati, insaturi, idrossilati insaturi, diacidi, composti ciclici idrossilati, azotati o meno, e sostanze idrossilate e azotate a basso indice di insaturazione, le quali ultime potrebbero essere strutture simili a carboidrati o amminozuccheri.

Ciascun composto ha un tempo di eluizione in colonna HPSEC analitica che lo caratterizza. In assenza di effetti di adsorbimento, maggiore il tempo di ritenzione e minore sarà il volume idrodinamico dell'analita,. Tale effetto tuttavia si verifica per queste sostanze, in quanto esse non sono veri e propri polimeri ma aggregazioni eterogenee di molecole. Perciò, la loro eluizione in HPSEC sfrutta l'effetto disaggregante dell'acido acetico, usato nel tampone come sale ammonico. In assenza dell'effetto disaggregante, le sostanze umiche si comportano in ESI-MS come una distribuzione di masse di difficile interpretazione. Tuttavia, una sostanza lipofila liberata dalla forte aggregazione con altre molecole umiche può interagire con la fase stazionaria ed essere ritenuta più a lungo nella colonna, indipendentemente dal peso molecolare apparente.

I tempi di ritenzione associati alle molecole rivelate sono elencati nella **Tabella 5.9**. Gli acidi grassi saturi lineari e ramificati hanno un tempo di eluizione intorno ai 27 minuti. Essi mostrano la caratteristica formula bruta con due ossigeni e un'insaturazione, caratteristiche del gruppo carbossilico, mentre il resto della molecola è necessariamente è alifatica. Escludendo ramificazioni per i composti a numero pari di carboni, e assegnando la caratteristica ramificazione

alle sostanze a numero dispari di C (Kaneda, 1991), si caratterizza questa componente in modo piuttosto inequivocabile, ed in analogia con quanto trovato per la controparte organosolubile di questa sostanza (**ORG2**). Tuttavia, la lunghezza media degli acidi grassi in questa frazione **ACQ2** è più breve rispetto a quanto riscontrato nella frazione organosolubile, e va dai dieci ai diciotto termini. Gli acidi ramificati non sono distinguibili in iso e anteiso con questa tecnica, ma sembra probabile che il picco sia associato a una miscela dei due isomeri.

Gli  $\alpha$ - $\omega$  diacidi, eluiti a tempo di ritenzione tipicamente tra i 23 e i 26 minuti, e identificati nelle frazioni organosolubili, sono presenti anche in **ACQ2**. Essendo queste specie dotate di due estremità polari e una lunga catena idrofoba centrale, è scontata la loro ripartizione tra fase acquosa e cloroformica. I composti a catena corta hanno un coefficiente di ripartizione favorevole verso l'acqua, e, infatti, la distribuzione di queste sostanze in **ACQ2** interessa composti a cinque, sei e nove termini. Gli acidi insaturi, altra classe presente in **ACQ2**, presentano un tempo di ritenzione intorno ai 28 minuti, e sono caratterizzati da catene da quindici a diciotto atomi di carbonio, che portano un'unica insaturazione. Le sostanze a numero dispari di atomi di carbonio a catena insatura sono piuttosto insolite per quanto visto fino a questo punto, ed è ipotizzabile che siano prodotti di decarbossilazione di un precursore ignoto o di deidrogenazione di un acido a numero dispari. Infine possiamo annoverare tra le sostanze lipidiche gli acidi idrossi-insaturi, con catena a cinque, sei, dieci, sedici o diciotto termini, in quest'ultimo caso è possibile un'insaturazione singola o doppia. Di queste il composto a sei termini è riscontrabile anche nella frazione analizzata come **RES0** (Vedi paragrafo 5.1). Il tempo di ritenzione per queste sostanze è compreso generalmente tra 25 minuti, per gli omologhi più brevi, e 28 per i più lunghi.

Il motivo che porta queste sostanze a bassa polarità a passare in una soluzione acquosa è chiaramente la loro associazione con altre sostanze più idrofili che, come degli acidi ciclici, di cui riscontriamo un substrato aromatico (acido benzoico), e i composti elencati in **Tabella 5-9**. Alcuni

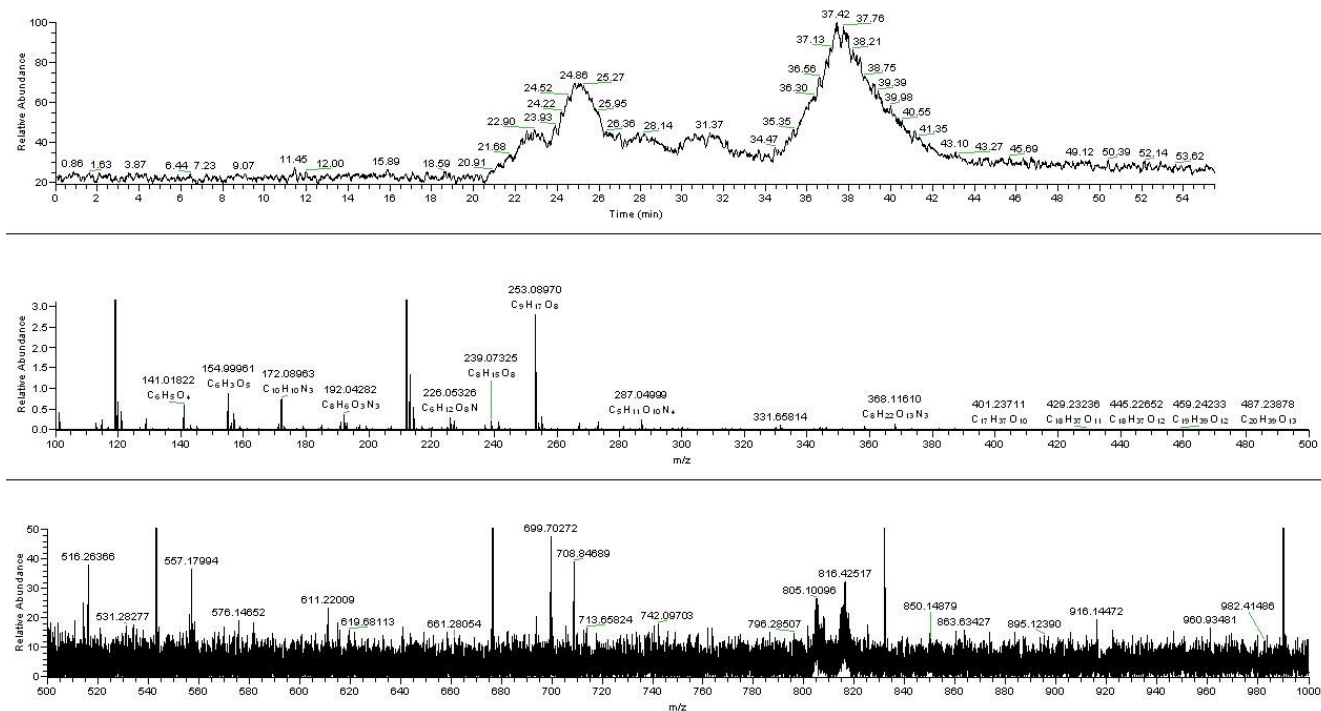
di essi presentano due o tre atomi di azoto in struttura, ma questo atomo è scarsamente caratterizzabile se associato a campioni di sostanze umiche.

Per alcune di queste sostanze cicliche è stata proposta una struttura in base ai risultati ottenuti per ESI-MS/MS di **RES4** (Vedi oltre nel capitolo). E' stato impossibile trovare riferimenti in letteratura riguardo molecole con questa formula e questo tipo di struttura accostate in HS. D'altro canto questo approccio analitico è innovativo e può cogliere elementi finora trascurati. I tempi di ritenzione per questi acidi sono compresi tra 23 e 28 minuti a seconda della struttura, con le due eccezioni per  $C_7H_6O_8$  (20 min) e il già citato acido benzoico (>45 minuti).

La parte quantitativamente più importante, ossia le sostanze che per rapporto  $C/H/(O+N)$  si avvicinano a strutture come carboidrati o i loro derivati amminici, sono presumibilmente ossidati a derivati aldarici o aldonici, i quali sono in grado di ionizzare più facilmente nella sorgente. I tempi di ritenzione per queste sostanze variano da 25 min nel caso del composto  $C_{10}H_{18}O_5N_2$  fino a un massimo di 38 min nel caso delle sostanze con formula  $C_7H_{14}O_4N_2$  e  $C_{12}H_{21}O_8N$ . Pur non essendo pienamente caratterizzabili per MS, l'ipotesi che si tratti di strutture simili a zuccheri è la più compatibile con gli spettri NMR discussi in seguito.

La trattazione qualitativa di questa sostanza è chiaramente parziale, dal momento che sono escluse le sostanze non ionizzabili.

**Figura 5.20:** Spettrogramma HPSEC-ESI-Orbitrap-MS (20  $\mu$ g iniettati) di ACQ2. In alto, cromatogramma. Al centro e in basso: ingrandimenti relativi a rispettivamente 100-500 e 500-1000 Dalton





**Tabella 5.9: Principali composti costituenti l'estratto ACQ2 associati ai tempi di ritenzione HPSEC-ESI-MS (min)**

Ac lineari	RT (min)	Ac ciclici	RT (min)
Ac. decanoico	27-28	Ac benzoico	>45
Ac. dodecanoico	27-28	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	23-35
Ac tetradecanoico	27-29	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	20-21
Ac esadecanoico	27-29	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	24-27
Ac ottadecanoico	27-29	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	25-27
Ac ramificati		C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	24-28
Ac pentadecanoico	27-28	Acidi azotati	
Diacidi		C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	35-38
Ac. pentandioico	25-26	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> N	30-33
Ac esandioico	23-25	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	25-26
Ac. nonandioico	24-25	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub> N	36-38
Ac insaturi		C <sub>10</sub> H <sub>29</sub> O <sub>7</sub> N <sub>5</sub>	29-32
Ac pentadecenoico	27-28	C <sub>12</sub> H <sub>31</sub> O <sub>6</sub> N <sub>5</sub>	32-34
Ac esadecenoico	27-28	C <sub>12</sub> H <sub>33</sub> O <sub>6</sub> N <sub>5</sub>	30-32
Ac eptadecenoico	27-29	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	30-32
Ac ottadecenoico	27-29	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	25-26
Ac insaturi ossidrilati		C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	29-32
Ac idrossipentenoico	25-26		
Ac idrossiesenoico	25-26		
Ac idrossidecenoico	26-28		
Ac idrossiesadecenoico	26-28		
Ac idrossiottadecadienoico	26-28		
Ac idrossiottadecenoico	27-29		

### 5.9.3 ACQ2: Analisi LC-MS, Aspetti quantitativi

Gli acidi lineari sono quantitativamente tra i meno rappresentati (95 µg/g di frazione) nel materiale **ACQ2**. La maggior parte della massa degli acidi grassi è infatti localizzata nella frazione organica, ma una parte è comunque solubilizzata nella fase acquosa nell'ambito di aggregati idrofili, i quali, infatti, non attraversano la membrana ultrafiltrante usata per desalificare l'estratto. I più abbondanti omologhi della serie sono nell'ordine i derivati a sedici, diciotto e quattordici carboni. Gli acidi ramificati sono rappresentati unicamente da acidi a quindici termini, come somma delle due isoforme. Negli acidi insaturi si registra un'anomalia quantitativa, in quanto il composto più abbondante è a sedici termini, mentre è di solito l'omologo ottadecenoico/oleico ad essere più abbondante. Gli acidi idrossilati insaturi hanno il loro massimo in corrispondenza degli omologhi

più brevi nella serie. Gli acidi più lunghi della serie, incluso il derivato di-insaturo, hanno un'abbondanza rilevante.

I composti ciclici sono i più abbondanti nella frazione **ACQ2**, così come lo erano per il materiale di partenza. Il composto più rappresentato è l'acido benzoico, seguito dai composti contenenti azoto  $C_8H_7O_3N_3$  e  $C_9H_8O_3N_2$ . Al secondo posto per abbondanza troviamo infine gli acidi a struttura glucidica, azotati e non, che complessivamente rappresentano 0.258 mg per ogni g dell'estratto iniziale.

Questi risultati, con le deviazioni standard percentuali, sono riassunti in maggior dettaglio nella **Tabella 5.10**.

**Tabella 5.10: Quantità di sostanza ( $\mu\text{g/g}$  di materiale) e deviazione standard percentuale rilevate per le principali classi di molecole di ACQ2 analizzate in HPSEC-ESI-MS**

Ac lineari	$\mu\text{g/g}$	dev. st.	Ac ciclici	$\mu\text{g/g}$	dev. st.
Ac. decanoico	5,00	26,07	Ac benzoico	1106,21	11,44
Ac. dodecanoico	6,91	44,45	$C_6H_6O_4$	58,93	9,51
Ac tetradecanoico	6,93	63,86	$C_7H_6O_8$	39,47	6,67
Ac esadecanoico	72,50	123,97	$C_9H_8O_3N_2$	138,41	1,05
Ac ottadecanoico	3,77	100,13	$C_8H_7O_3N_3$	296,01	3,41
Ac ramificati			$C_{10}H_{11}O_3N_3$	51,36	2,87
Ac pentadecanoico	50,97	101,08	Acidi azotati		
Diacidi			$C_7H_{14}O_4N_2$	6,91	19,71
Ac. pentandioico	2,02	9,56	$C_7H_{13}O_6N$	30,10	12,15
Ac esandioico	4,76	9,79	$C_{10}H_{18}O_5N_2$	17,25	14,74
Ac. nonandioico	2,16	4,07	$C_{12}H_{21}O_8N$	9,33	24,39
Ac insaturi			$C_{10}H_{29}O_7N_5$	49,68	4,00
Ac pentadecenoico	11,85	92,58	$C_{12}H_{31}O_6N_5$	6,73	23,70
Ac esadecenoico	116,03	106,41	$C_{12}H_{33}O_6N_5$	30,31	14,76
Ac eptadecenoico	11,18	108,97	$C_{16}H_{30}O_5N_2$	28,20	15,36
Ac ottadecenoico	27,19	105,04	$C_{16}H_{29}O_6N_3$	68,24	5,80
Ac insaturi ossidrilati			$C_{18}H_{34}O_6N_4$	11,54	13,11
Ac idrossipentenoico	27,27	25,51			
Ac idrossiesenoico	25,52	17,59			
Ac idrossidecenoico	11,97	67,51			
Ac idrossiesadecenoico	8,77	118,57			
Ac idrossiottadecadienoico	14,02	110,06			
Ac idrossiottadecenoico	15,38	99,86			

#### 5.9.4 ACQ2: Rese e vantaggi del processo di analisi

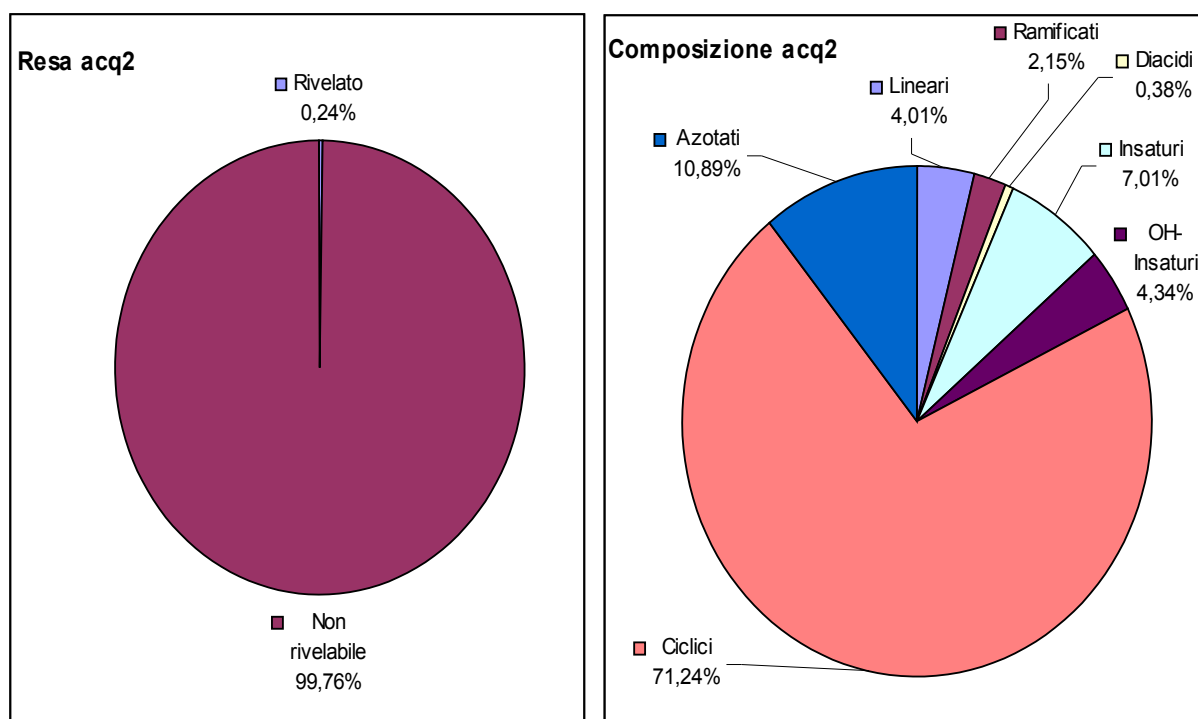
Le rese quantitative dell'analisi HPSEC-ESI-MS dei composti debolmente legati alla matrice sono piuttosto modeste rispetto al materiale di partenza (**RES0**), analizzato con la stessa tecnica. La tecnica analitica ESI-MS caratterizza solo una piccola parte della massa del campione. In presenza di molecole con  $pK_a$  più basso delle funzioni alcoliche la ionizzazione ESI delle stesse è svantaggiata. Come già descritto nel paragrafo 5.1, anche **ACQ2** presenta la caratteristica di ridurre la risposta degli standard interni. In termini quantitativi questa frazione **ACQ2** è la più efficace nel deprimere la rivelabilità degli standard interni, la cui spiegazione può essere ricollegata alla presenza nello spray di una grande quantità di molecole non volatili di difficile ionizzazione e che interferiscono nella misura.

Contrariamente a questo aspetto limitativo, la tecnica ESI-MS sembra più in grado di rivelare sostanze contenenti azoto presenti in questa frazione **ACQ2**. L'atomo di azoto è misurato nelle sostanze umiche tramite analisi elementare distruttiva, ma l'individuazione di composti che lo contengono non è di semplice attuazione. Le sostanze generalmente associate alla sostanza organica naturale contenenti azoto sono generalmente di tipo aminosaccaridico e aminoacidico (Stevenson, 1994). Queste sostanze sono piuttosto idrofiliche e quindi la ricerca delle stesse nella frazione più idrofila dell'acido umico appare la strategia più appropriata. Il contenuto di azoto può essere anche inteso come uno dei fattori che contribuisce alla spiccata solubilità in acqua del materiale **ACQ2**. La protonazione dei gruppi amminici potrebbe essere uno dei meccanismi che allarga l'intervallo di pH in cui questa frazione si scioglie. La quantità di sostanze azotate nel campione è rilevante, come si evince dalla **Figura 5.21a-b**. La composizione del campione a livello molecolare è rappresentata nella stessa figura.

L'analisi ESI-MS mostra una composizione molecolare fortemente idrofilica della frazione **ACQ2**. Gli acidi ciclici, fortemente ossigenati, sono la sostanza più rappresentata del campione. La rivelabilità di queste sostanze alla tecnica potrebbe essere modulata positivamente da ionizzazione o

vaporizzazione superiore rispetto alle sostanze più lipofile. Il dato dell'acido benzoico (1 mg/g peso iniziale) farebbe pensare a un carattere fortemente aromatico, tuttavia ciò è smentito dall'analisi CP-MAS dello stesso campione (Vedi sezione NMR del capitolo). Infine, le sostanze lipofile sono quantitativamente classificate nell'ordine: acidi insaturi>idrossiinsaturi>lineari>diacidi (**Figura 5.21a-b**). La presenza ubiquita di acidi lineari anche nella frazione **ACQ2**, che dovrebbe essere incompatibile con i lipidi, suggerisce che i composti lineari svolgono un ruolo fondamentale nello stabilizzare gli aggregati di composti idrofilici e sono co-estratti con essi. La tendenza da parte delle specie chimiche a lunga catena a organizzarsi in micelle contribuisce probabilmente a generare la continuità dell'architettura supramolecolare delle HS in soluzione.

**Figura 5.21a-b:** Resa analitica (%) totale dei composti rivelati di ACQ2 rispetto al peso dell'estratto totale (a sinistra) e composizione molecolare percentuale (a destra)



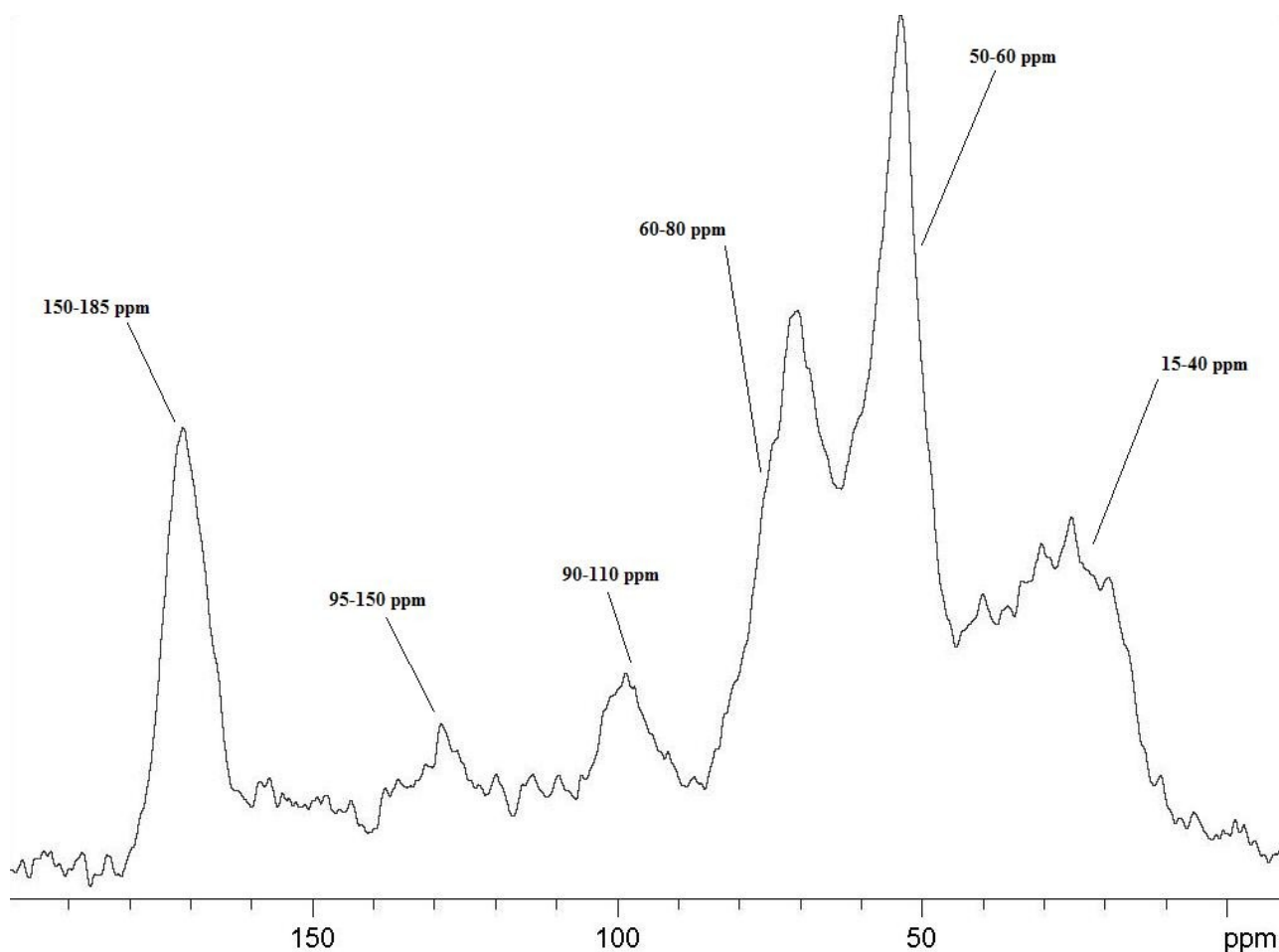
## 5.10 Spettroscopia NMR di componenti idrosolubili debolmente legate alla matrice

### 5.10.1 ACQ2: Spettroscopia $^{13}\text{C}$ NMR in fase solida

La sostanza **ACQ2** ha un carattere fortemente idrofilo, e infatti il suo spettro CP-MAS mostra un profilo in linea con questa proprietà. Esso infatti presenta sei raggruppamenti principali di segnali (**Figura 5.22**), da sinistra carbonilici (>150 ppm), aromatici (100-150 ppm), anomerici (90-100 ppm), saccaridici (70-80 ppm), ossialchilici (50-70 ppm) e alifatici (<40 ppm). Le regioni più rappresentate sono costituite dai carbossili, dai saccaridi e dagli idrossialchilici, molto bassa è l'intensità degli aromatici e alifatici.

Questi dati indicano che **ACQ2** è composta soprattutto da materiale organico saccaridico. Questo materiale è stato evidentemente scisso dall'azione del trifluoruro di boro ed estratto dalla fase acquosa durante l'estrazione Liq/Liq. I risultati quantitativi LC-MS suggeriscono una forte componente aromatica, ma l'osservazione dello spettro CP-MAS è in disaccordo. Nello spettro NMR i segnali aromatici sono di modesta intensità. Questo errore di stima è dovuto a una diversa risposta delle sostanze lineari rispetto a quelle cicliche nell'analisi MS. Nella spettroscopia NMR la risposta di tutti i nuclidi è molto più omogenea, e pertanto questo dato è affidabile.

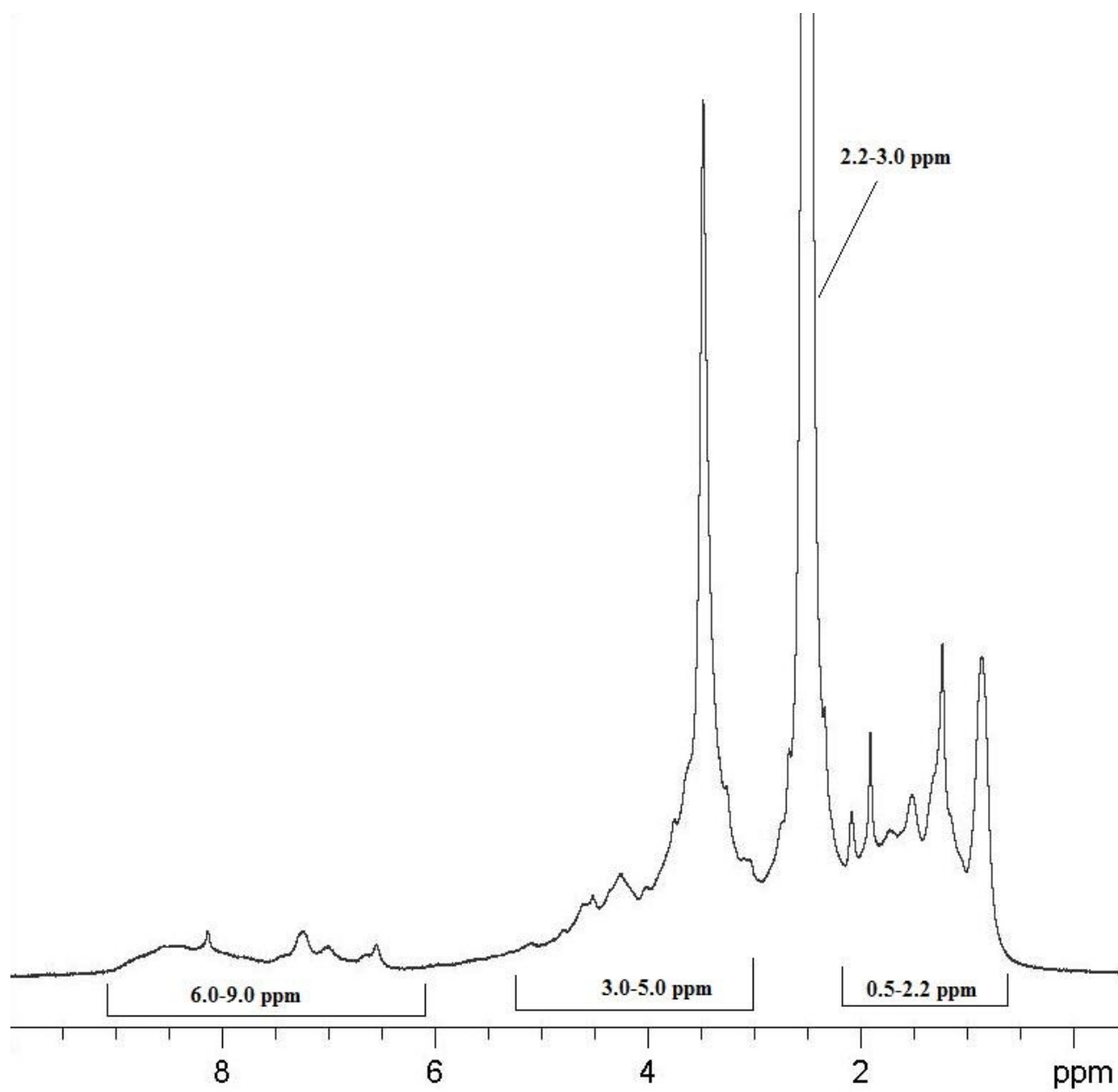
**Figura 5.22:**  $^{13}\text{C}$  NMR CP-MAS di ACQ2 (ppm)



#### 5.10.2 ACQ2: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione

Alla luce dei dati CP-MAS ci si aspetterebbe uno spettro  $^1\text{H}$  NMR monodimensionale ricco in segnali ossialchilici, e infatti le regioni più rappresentate sono tra 2.20 e 3.30 ppm (protoni prossimi a una funzione elettronegativa) e 3.00-4.50 ppm. Regioni aromatiche (6.00-9.00 ppm) e alifatiche (0.50-2.00) sono meno rappresentate ma comunque rilevanti. I segnali inoltre sono piuttosto larghi rispetto agli spettri di frazioni organosolubili. (**Figura 5.23**)

**Figura 5.23:**  $^1\text{H}$  NMR 1D di ACQ2 in  $\text{dms}\text{-d}_6$  (ppm)



### 5.10.3 ACQ2: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione

Gli spettri sono illustrati in **Figure 5.24a-c**. Lo spettro HSQC (**Figura 5.24c**) della sostanza **ACQ2** si presenta piuttosto definito, al contrario di quanto visto per lo spettro 1D <sup>1</sup>H NMR. Le principali correlazioni sono nella regione aromatica (H=7.00-8.00, C=100-150 ppm) con due interazioni, nella regione ossialchilica (H=3.00-4.50, C=50-75 ppm) nella regione anomerica (H=4.50, C=100 ppm) e nella regione alifatica (H= 0.75-2.00, C=10-40 ppm). Non è stato possibile ottenere spettri HMBC di qualità soddisfacente per questa sostanza.

Lo spettro COSY (**Figura 5.24a**) è scarsamente definito, inoltre esso presenta esclusivamente correlazioni nella regione alifatica (0.75-2.50 ppm).

Lo spettro TOCSY (**Figura 5.24b**) invece si presenta meglio definito con una buona densità di correlazioni. Distinguiamo interazioni tra protoni aromatici (7.00-9.00 ppm) molto deschermati, forse derivati solfonici, e alcuni raggruppamenti attribuibili a 1) correlazioni tra due protoni idrossialchilici (3.00-4.50 ppm), 2) correlazioni tra due protoni alifatici (0.75-2.00 ppm) e 3) correlazioni tra due protoni appartenenti ai due diversi intervalli.

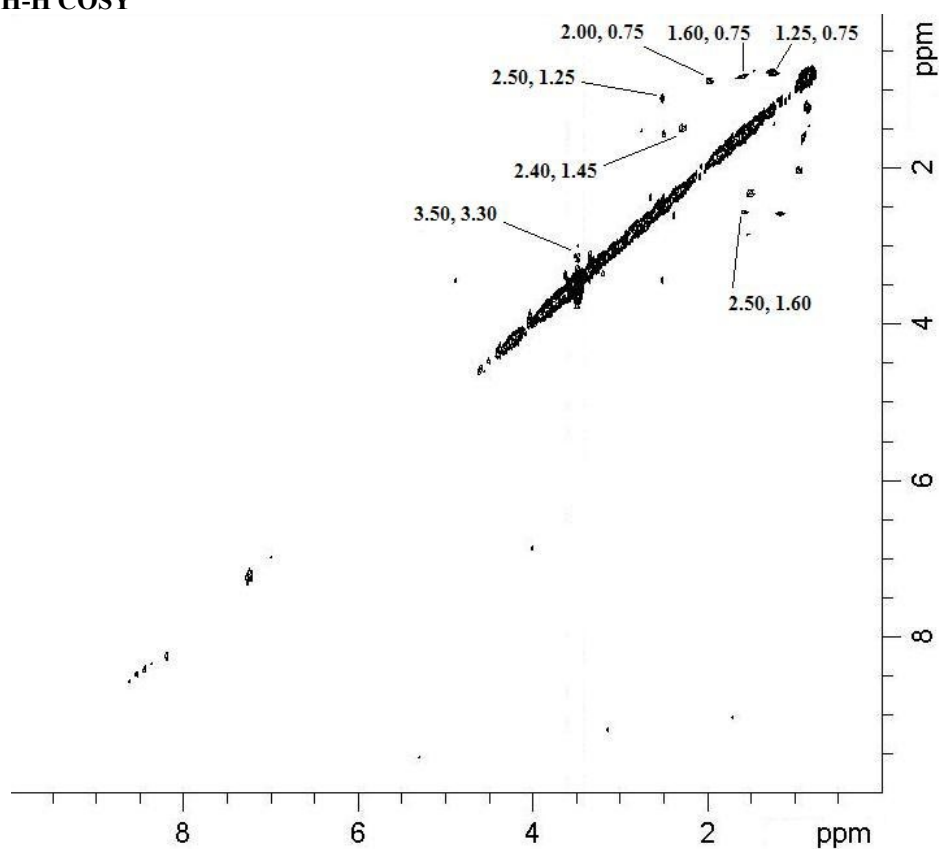
Avendo informazioni poco dettagliate l'attribuzione delle sostanze per questa frazione risulta piuttosto speculativa. Pertanto, si può unicamente affermare che la sostanza **ACQ2** sia di tipo saccaridico, con una percentuale di acidi lineari, saturi o idrossilati e aromatici. Questi dati sono in accordo con le osservazioni emerse dall'analisi qualitativa della stessa sostanza in LC-MS.

I picchi di correlazione sono riassunti nella **Tabella 5.11**.

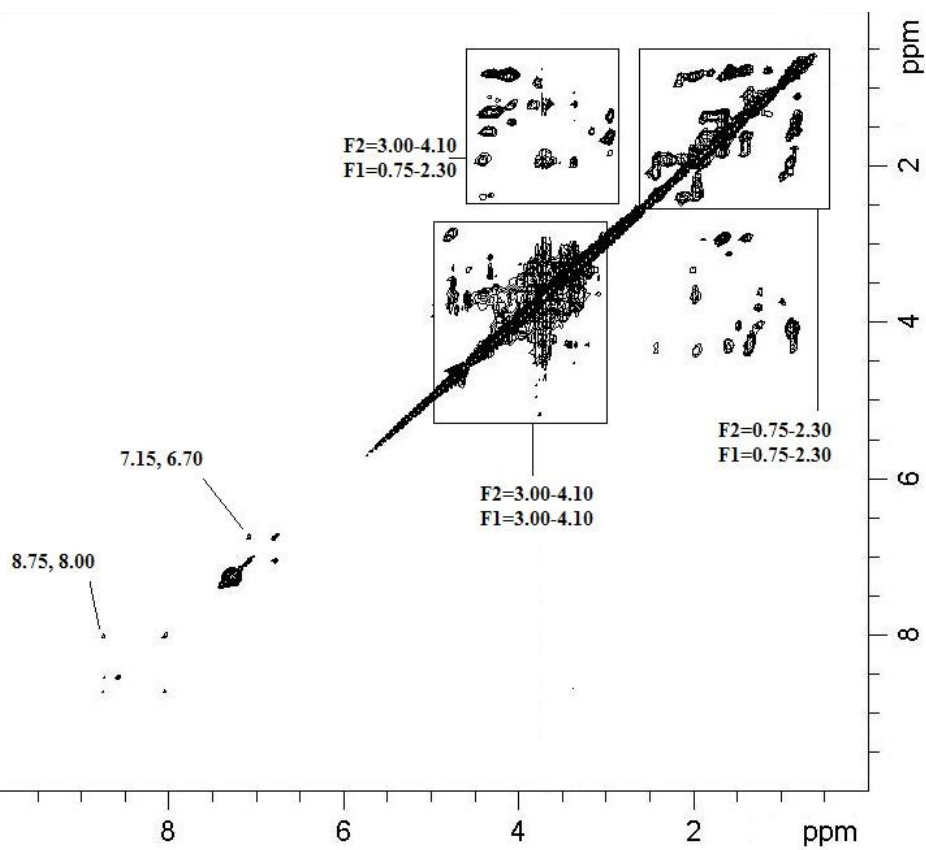


**Figure 5.24a-c: Spettri NMR bidimensionali di ACQ2 in dmso-d<sup>6</sup> (ppm)**

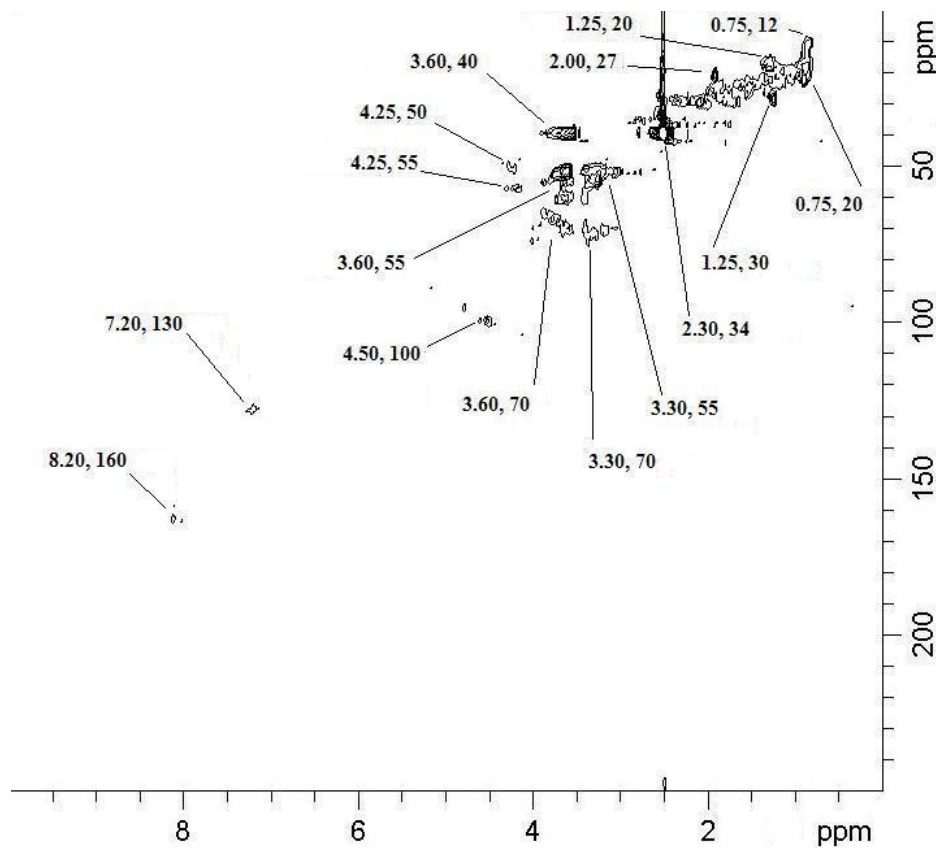
**Figura 5.24a: H-H COSY**



**Figura 5.24b: H-H TOCSY**



**Figura 5.24-c: H-C HSQC**



**Tabella 5.11: Riassunto delle correlazioni bidimensionali in ACQ2 (F2= $^1\text{H}$ , F1= $^{13}\text{C}$ , ppm)**

$J^1_{\text{H-C}}$	$J^{2-3}_{\text{H-H}}$	$J^{\text{long range}}_{\text{H-H}}$
F2, F1	F2, F1	F2, F1
8.20, 160	3.50, 3.30	8.75, 8.00
7.20, 130	2.50, 1.60	7.15, 6.70
4.50, 100	2.50, 1.25	3.00-4.10, 3.00-4.10
4.25, 55	2.40, 1.45	3.00-4.10, 0.75-2.30
4.25, 50	2.00, 0.75	0.75-2.30, 0.75-2.30
3.60, 70	1.60, 0.75	
3.60, 55	1.25, 0.75	
3.60, 40		
3.30, 70		
3.30, 55		
2.30, 34		
2.00, 27		
1.25, 30		
1.25, 20		
0.75, 20		
0.75, 12		

## 5.11 Analisi MS di componenti organosolubili fortemente legate alla matrice (ORG3)

### 5.11.1 Aspetti generali

La componente fortemente legata è costituita dalle molecole legate strutturalmente alla matrice unica con legami esteri e con scarsa accessibilità all'attacco nucleofilo. Non sono perciò idrolizzabili per effetto di un acido di Lewis come il  $\text{BF}_3$ , ma scissi solo in seguito a trattamento di solvolisi alcalina con KOH. Il legame estereo è il legame idrolizzabile più diffuso nella biochimica delle forme viventi, ed è sensibile all'attacco di acidi e basi forti. Tuttavia parte della sostanza organica naturale è spesso difficilmente accessibile al reagente utilizzato per la solvolisi. L'impiego di metanolo come solvente genera derivati metilici degli acidi carbossilici, ma l'azione dello ione idrossido introdotto come KOH provoca una parziale idrolisi basica che, essendo irreversibile, è favorita termodinamicamente. L'estratto metanolico, dibattuto in un sistema acqua/cloroformio si ripartisce in una parte apolare (**ORG3**) e una polare (**ACQ3**). Quest'ultima si è rivelata gravimetricamente quasi nulla, al punto da risultarne impossibile l'analisi.

L'estratto **ORG3** è stato invece sottoposto ad analisi dopo la derivatizzazione delle funzioni più polari come ossidrili e carbossili con formazione di derivati metilici e trimetilsililici. Le aree dei picchi del cromatogramma sono state confrontate con standard esterni per quantificare ciascuna componente. L'estratto **ORG3**, a differenza delle altre frazioni, ha una consistenza non propriamente solida, e miscibilità limitata con i solventi organici. L'impatto della separazione in SPE sulla caratterizzazione delle singole molecole presenti nel campione è stato preso in considerazione e la fase stazionaria SPE in silice diretta è stata selezionata come metodo di omogeneizzazione del campione. L'effetto della separazione delle sostanze in funzione della polarità è stato valutato confrontandolo con l'estratto **ORG3** non trattato. L'effetto del co-solvente piridina, in ambiente anidro, nella derivatizzazione delle molecole è stato confrontato con il metodo tradizionale di derivatizzazione con solo agente sililante a fungere anche da solvente. Queste

considerazioni sono state fatte in funzione dell'efficienza dell'analisi intesa come resa di ciascun composto rispetto alla quantità di materiale (**ORG3**).

#### *5.11 2 ORG3: Analisi GC-MS, Aspetti qualitativi*

Come la componente libera e quella debolmente legata, anche la componente fortemente legata è composta principalmente da acidi grassi saturi, a struttura lineare o ramificata, acidi insaturi, acidi idrossilati,  $\alpha$ ,  $\omega$  diacidi, alcoli lineari a lunga catena, idrocarburi, acidi aromatici, aminoacidi, steroli e sostanze poliossidrilate come i carboidrati. Non sono stati trovati invece acido deidroabietico o alanina.

I risultati sono riassunti nelle **Tabelle 5.12** e **5.13**. Si riscontrano acidi lineari a catena variabile da dodici a venti termini che la derivatizzazione **sil** (sililante senza cosolvente) rileva in modo più dettagliato. I composti sono prevalentemente metilati, come risultato del processo di solvolisi. L'approccio **pyr** (piridina come cosolvente in ambiente anidro) si limita a evidenziare composti a quattordici, sedici e diciotto atomi di carbonio. Questo dato è in accordo con quanto già osservato per le frazioni **ORG1** e **ORG2**. Alla luce di tre controprove, è stato appurato che la strategia **pyr** ha dei limiti qualitativi per il rilevamento degli omologhi meno abbondanti di queste categorie di sostanze. Il rilevamento di notevoli quantità di derivati sililesteri nella reazione con piridina suggerisce che questa strategia non preserva l'integrità dei gruppi carbossimetilici.

In linea con i dati per le frazioni organiche analizzate in precedenza, anche in questo caso sono stati rilevati acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio. Queste strutture presentano ramificazione con configurazione iso o anteiso. La tecnica di separazione GC separa questi derivati isomeri e ne permette l'identificazione in MS. Queste sostanze sono presenti come derivati metilesteri. La silice SPE permette l'omogeneizzazione di queste sostanze eluendole in modo sufficientemente selettivo nella frazione **lip** (frazione lipofila a bassa forza eluente). Le specie riscontrate per questa categoria sono le medesime rispetto alle frazioni analizzate in precedenza,

ovvero catene a quindici o diciassette atomi di carbonio con entrambi i tipi di ramificazione. Per questa classe di composti, entrambe le strategie di derivatizzazione si sono mostrate efficienti.

Gli acidi di-funzionali, già riscontrati in altri estratti (**ORG1**, **ORG2**) sono analizzati con la derivatizzazione **pyr**. E' presente un'unica specie, l'acido azelaico (otto atomi di carbonio). La derivatizzazione **sil**, invece, non è adatta a questi composti infatti la loro risposta strumentale è sotto il limite di rivelabilità. A questo effetto contribuiscono probabilmente fenomeni di idrolisi degli addotti TMS. Questo è infatti il derivato più comune per questa classe sostanze. La porzione alifatica di questa molecola ne determina l'eluizione nella porzione più lipofila dell'eluato, la frazione **lip**.

Gli acidi insaturi, originati prevalentemente da lipidi delle membrane cellulari, sono ben rappresentati nel materiale **ORG3**. Essi sono derivatizzati come metilesteri o trimetilsililesteri. La seconda forma derivatizzata è prevalente se viene usata piridina nella miscela reagente. Come riportato per altre sostanze, questo dato suggerirebbe che gli esteri metilici sono instabili in queste condizioni. Una sola specie è riscontrabile nel campione **sil**, l'acido linoleico, mentre l'approccio **pyr** rivela un numero maggiore di acidi a diciotto atomi di carbonio, tra cui strutture molto diffuse come acidi oleico, linoleico, palmitelaidico, derivatizzati come sililesteri. La presenza in quantità di queste sostanze mono- e di-insature può essere messa in relazione con la consistenza deliquescente del campione. Queste sostanze sono accumulate nella frazione SPE a bassa forza eluente.

Gli acidi grassi lineari idrossilati appaiono meno importanti in questo materiale **ORG3**, rispetto a quanto riportato per **ORG1** e **ORG2**. Gli esteri di questi acidi sono, in virtù della loro struttura poco ingombrata, più labili alla transesterificazione. Questo elemento giustifica la scarsa abbondanza riscontrata per queste sostanze nel materiale fortemente legato alla matrice. Un'anomalia rispetto ai dati finora riportati è che, in **ORG3**, le due uniche sostanze di rilievo, gli  $\omega$ -idrossiacidi metilati a sedici e diciotto termini, carbossi-metilati e idrossi-sililati, si osservano nei cromatogrammi ottenuti per sililazione tradizionale. Nelle frazioni **ORG1** e **ORG2** invece, la

strategia con piridina dava migliori risultati. L'interazione con la silice in SPE di queste sostanze è bassa ed esse sono raccolte nella frazione a più bassa polarità.

Le sostanze derivanti dalla degradazione della lignina, a struttura aromatica, sono molto ben rappresentate in **ORG3**. In termini qualitativi osserviamo derivati metilesteri o trimetilsililesteri con pattern di sostituzione variabile da uno a tre sostituenti (vedi sostituzioni in **Tabella 5.13a-b**). Una sostanza non osservata in precedenza negli altri estratti organosolubili, l'acido dimetossimandelico, analogo metossilato dell'acido 2-idrossi, 2-fenilacetico, è riscontrabile con entrambe le condizioni **sil** e **pyr**. L'ossidrilico di questa struttura, in posizione ingombrata, forma esteri resistenti al trattamento di transesterificazione acida, mentre il nucleofilo metossido con le sue dimensioni ridotte è evidentemente in grado di catalizzare la solvolisi nelle condizioni alcaline. Queste molecole sono scarsamente ritenute dalla silice della SPE e sono riscontrabili quasi esclusivamente nella frazione **lip**.

Gli n-alcoli a lunga catena sono discretamente rappresentati nel materiale **ORG3**. Particolare rilievo hanno le strutture a lunghezza compresa tra quattordici e venti termini per la derivatizzazione **sil**, mentre l'approccio **pyr**, produce omologhi a lunghezza variabile tra dodici e diciotto termini. La lunghezza della catena idrofobica conferisce a queste molecole un carattere lipofilo. Perciò, esse sono scarsamente ritenute in colonna SPE, e la frazione in cui sono maggiormente abbondanti è quella **lip**.

La scissione di numerosi legami esterei ha liberato materiale idrocarburico (alcani/alcheni) che era precedentemente protetto dalla struttura compatta della matrice umica. Questo fenomeno è stato osservato in precedenza anche per **ORG2**. Queste sostanze non sono derivatizzabili, ma sono rapidamente eluite dal supporto SPE nella frazione **lip**. Tuttavia, parte di esse viene rallentata, probabilmente dall'interazione con il resto del campione, ed è raccolta in **hyd** (frazione più idrofila), dove la loro distribuzione varia dai ventinove agli oltre quaranta minuti di tempo di ritenzione in colonna GC. Rispetto a quanto visto in precedenza per **ORG2** questo materiale è

caratterizzato da idrocarburi a catena più lunga. Queste sostanze sono quindi associate tanto più tenacemente alla matrice dell'HA quanto più lunga è la loro catena. In base a queste valutazioni deriva che l'interazione, costituita da forze di Van der Waals e interazioni idrofobiche, aumenta di intensità con il peso molecolare. La derivatizzazione tradizionale **sil** si è rivelata la migliore per l'analisi di queste sostanze. Questo risultato di difficile interpretazione è comunque in accordo con quanto riportato in relazione alle sostanze debolmente legate alla matrice (**ORG2**). Poiché, i composti poliossidrilati, rivelati come sililderivati, sono poco rappresentate in **ORG3**, esse sono state presumibilmente già solvate precedentemente durante l'idrolisi in ambiente acido. L'ambiente acido è infatti abbastanza reattivo nei confronti dei legami glicosidici. Si sono riscontrati solo due picchi a tempi di ritenzione 16.4 e 21.0 min con il trattamento **sil**, mentre l'impiego del cosolvente (**pyr**) evidenzia un'unico picco a 15.0 min. In generale l'approccio **pyr** è stato sempre ottimale per l'analisi di queste specie, e il caso descritto costituisce un'importante eccezione. Queste sostanze sono generalmente accumulate nella frazione SPE **hyd**.

Per la caratterizzazione molecolare di **ORG3**, l'uso della SPE su silice è sconsigliabile, in quanto il suo vantaggio principale, cioè l'accumulo di sostanze poliossidrilate nella frazione a eluizione lenta, non avviene a causa della bassa concentrazione di queste sostanze tra i composti fortemente legati. Inoltre, la rivelabilità associata al materiale precedente al trattamento su SPE di silice è generalmente superiore alla somma delle frazioni (dati non riportati). Questa incongruenza potrebbe essere dovuta alla contaminazione provocata dalla dissoluzione di parte della silice ad opera del metanolo.

L'utilizzo della piridina come cosolvente produce un aumento generale della risposta quantitativa per tutte le molecole. Tuttavia, per gli acidi grassi si osserva una mancata individuazione degli omologhi meno abbondanti. Questo limite è controbilanciato però da un notevole aumento della resa analitica complessiva delle sostanze riferite al materiale iniettato.

La **Tabella 5.12** riassume lo schema di migrazione differenziale in SPE dei composti e la strategia ottimale di derivatizzazione.

**Tabella 5.12:** Principali categorie di composti costituenti l'estratto **ORG3** associati alla frazione SPE di eluizione preferenziale e le migliori condizioni di derivatizzazione riscontrate

Categoria	Ac. lineari	Ac. ramificati	Ac insaturi	Ac idrossilati	Alcoli	Poliidrossilati	Ac. aromatici	Idrocarburi	Diacidi
SPE	lip	lip	lip	lip	lip	hyd	lip	lip	lip
Sililante	sil	sil, pyr	pyr	sil	sil, pyr	sil	sil, pyr	sil	pyr

**Legenda:**

**SPE:** Frazione SPE con maggior quantità di composto

**Sililante:** Condizioni di sililazione ottimali

**sil:** Reagente sililante

**pyr:** Piridina con 3% sililante

**lip:** Frazione lipofila (3:1 cloroformio:metanolo)

**hyd:** Frazione idrofila (3:1 metanolo:cloroformio)

### 5.11.3 ORG3: Analisi GC-MS, Aspetti quantitativi

Gli acidi lineari sono prevalentemente a sedici e diciotto atomi di carbonio, e rappresentano la categoria tra le più abbondanti nella composizione del campione, comunque esso sia derivatizzato (**Tabella 5.13a-b**). Gli analoghi ramificati sono meno rappresentati, contribuendo solo del 2-3% a seconda della derivatizzazione. Per gli acidi ramificati gli analoghi a quindici termini sono maggiormente rappresentati. Gli acidi insaturi sono molto abbondanti in **ORG3** come suggerisce peraltro la sua consistenza oleosa. Essi rappresentano la classe più abbondante secondo i dati dei cromatogrammi relativi ai campioni derivatizzati in piridina. Sono rappresentati molti acidi che svolgono un ruolo di modulazione della rigidità delle membrane cellulari, ed in particolare l'acido oleico e linoleico sono i più abbondanti. Gli acidi idrossilati, con sostituzione terminale con catena a sedici e diciotto termini sono quantificati attorno al 2% con derivatizzazione **sil**, mentre la loro quantità è irrilevante se si applica la procedura **pyr**. Anche gli acidi difunzionali sono meno rappresentati in questa frazione **ORG3**. Infatti, la loro abbondanza è irrilevante per derivatizzazione



**sil**, mentre per **pyr** essi ammontano al 5% della massa totale. Questo dato è riferito all'unico composto riscontrato, l'acido azelaico (ottandioico).

Gli acidi aromatici rappresentano una delle classi più abbondanti, e la loro massa è rappresentativa del 14% e 29% del peso totale in funzione dei metodi di sililazione **pyr** e **sil**, rispettivamente. Il più abbondante è l'acido 4-idrossi, 3-metossibenzoico, un costituente fenolico di origine ligninica. Questo risultato è in linea con l'origine forestale del suolo Vico, dove la vegetazione arborea contribuisce alle sostanze umiche con lignina ricca di residui guaiacilici, precursori del 4-idrossi, 3-metossibenzoico (Burges et al., 1964).

La quantificazione degli alcoli nell'estratto dei componenti fortemente legati ha mostrato una dipendenza dal metodo di derivatizzazione. La sililazione **sil** infatti evidenzia un contributo del 15%, mentre quella per **pyr** è stata del solo 1%. E' possibile che questa discrepanza sia in realtà più un risultato dell'aumento della risposta di tutte le altre sostanze che la strategia **pyr** ha determinato, piuttosto che una diversa reattività. Di questa serie i contributi più rilevanti sono portati dagli alcoli a dodici e quattordici termini.

I composti idrocarburici sono poco rappresentati nella frazione organosolubile **ORG3**, e sono rilevati solo per derivatizzazione **sil**. I più abbondanti identificati per il loro tempo di ritenzione, corrispondono nel cromatogramma a RT 38.9 e 40.1 minuti. Molto poco rilevanti sono le sostanze poliossidrilate, indipendentemente dal metodo di preparazione del campione, e quantificabili intorno allo 0.1% dei composti rilevati

Questi risultati sono riassunti in maggior dettaglio nella **Tabella 5.13a-b**.

**Tabella 5.13a-b: Quantità di sostanza (µg/g) e deviazione standard percentuale per le categorie di molecole in ORG3. Idrocarburi e sostanze polioidrossilate sono indicate con il loro tempo di ritenzione**

**Tabella 5.13a: Sililazione senza cosolvente (1 replica)**

Ac lineari	µg/g	Alcoli	µg/g
Ac dodecanoico	345.23	Dodecanolo	32.80
Ac tetradecanoico	776.38	Tetradecanolo	3764.77
Ac pentadecanoico	521.67	Esadecanolo	153.58
Ac esadecanoico	4401.09	Ottadecanolo	449.98
Ac eptadecanoico	151.70	Eicosanolo	344.86
Ac ottadecanoico	2193.37	<b>Idrocarburi</b>	
Ac eicosanoico	87.66	RT 29.5	40.15
Ac docosanoico	369.44	RT 31.5	56.09
<b>Ac ramificati</b>		RT 33.4	54.90
Ac pentadecanoico iso	276.63	RT 35.3	46.88
Ac pentadecanoico anteiso	33.31	RT 37.0	87.16
Ac 10-metiltetradecanoico	130.33	RT 38.9	137.68
Ac eptadecanoico iso	152.46	RT 40.5	133.25
Ac eptadecanoico anteiso	220.94	RT 42.1	73.25
<b>Ac insaturi</b>		RT 43.7	30.39
Ac linoleico	3961.48	RT 45.2	11.16
<b>Ac idrossilati</b>		<b>Poliidrossilati</b>	
Ac ω-idrossiesadecanoico	444.48	RT 16.4	24.22
Ac ω-idrossiottadecanoico	67.02	RT 21.0	5.99
<b>Ac aromatici</b>			
Ac 4-idrossibenzoico	1540.07		
Ac 4-idrossi, 3-metossibenzoico	3869.23		
Ac 4-idrossi, 3,5-dimetossibenzoico	1407.20		
Ac dimetossi mandelico	1221.00		

**Tabella 5.13b: Sililazione in piridina con 3% sililante (6 repliche)**

Ac lineari	µg/g	dev. st. %
Ac tetradecanoico	17638.15	33.65
Ac esadecanoico	126964.42	112.68
Ac ottadecanoico	152422.05	99.42
<b>Diacidi</b>		
Ac azelaico	44044.48	41.96
<b>Ac insaturi</b>		
Ac oleico	214082.60	80.00
Ac ottadecenoico	93532.20	88.75
Ac linoleico	71888.57	49.78
Ac palmitelaidico	28164.47	64.02
<b>Ac ramificati</b>		
Ac pentadecanoico iso	1649.21	24.79
Ac pentadecanoico anteiso	2301.48	33.95
Ac eptadecanoico iso	1418.39	47.53
Ac eptadecanoico anteiso	9213.52	98.78
<b>Ac aromatici</b>		
Ac 4-idrossibenzoico	3551.65	22.82
Ac 4-idrossi, 3-metossibenzoico	80058.41	43.74
Ac dimetossi mandelico	45999.73	158.96
<b>Alcoli</b>		
Dodecanolo	4338.20	19.03
Tetradecanolo	1364.75	48.12
Esadecanolo	497.22	23.89
Ottadecanolo	2537.81	11.45
<b>Poliidrossilati</b>		
RT 15.2	1012.72	17.81

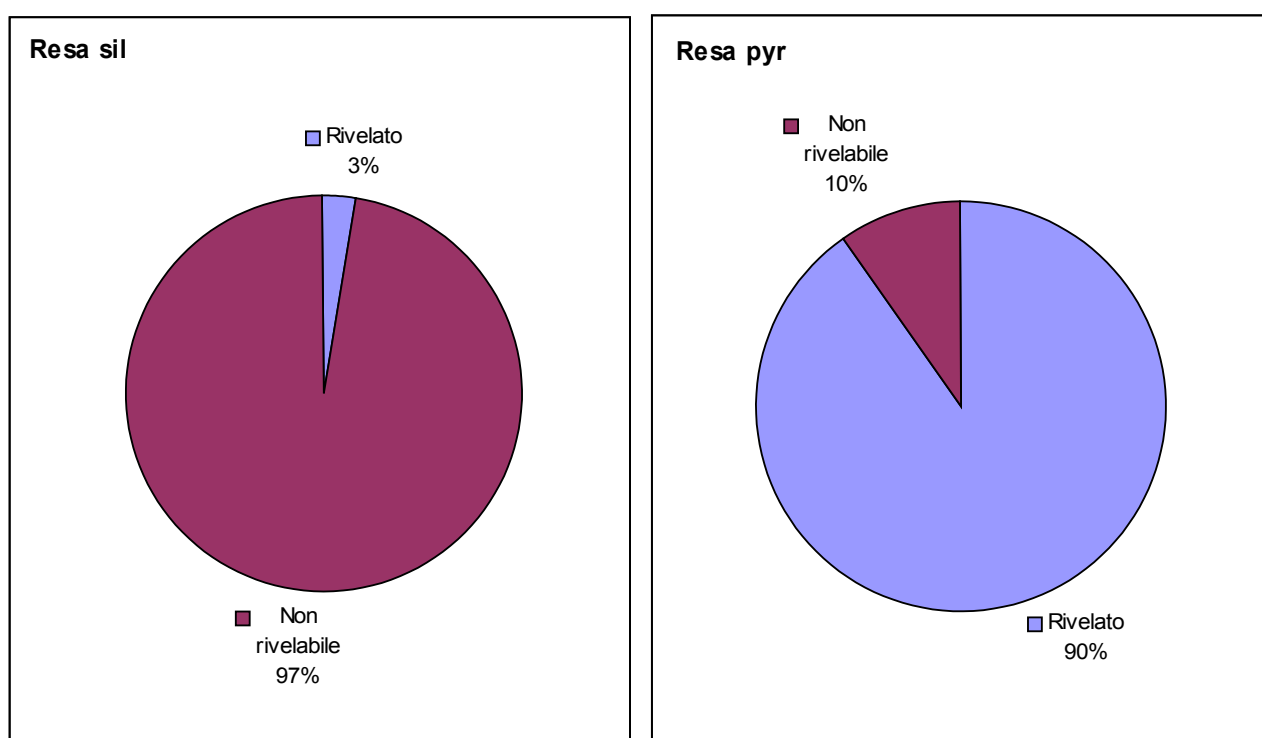
#### 5.11.4 ORG3: Rese del processo di analisi

Le rese dell'analisi quantitativa con i diversi approcci descritti (**sil** e **pyr**), intese come rapporto tra massa complessiva delle sostanze caratterizzate e peso dell'estratto o dell'acido umico di partenza, sono messe a confronto tra loro per valutare le migliori condizioni di derivatizzazione.

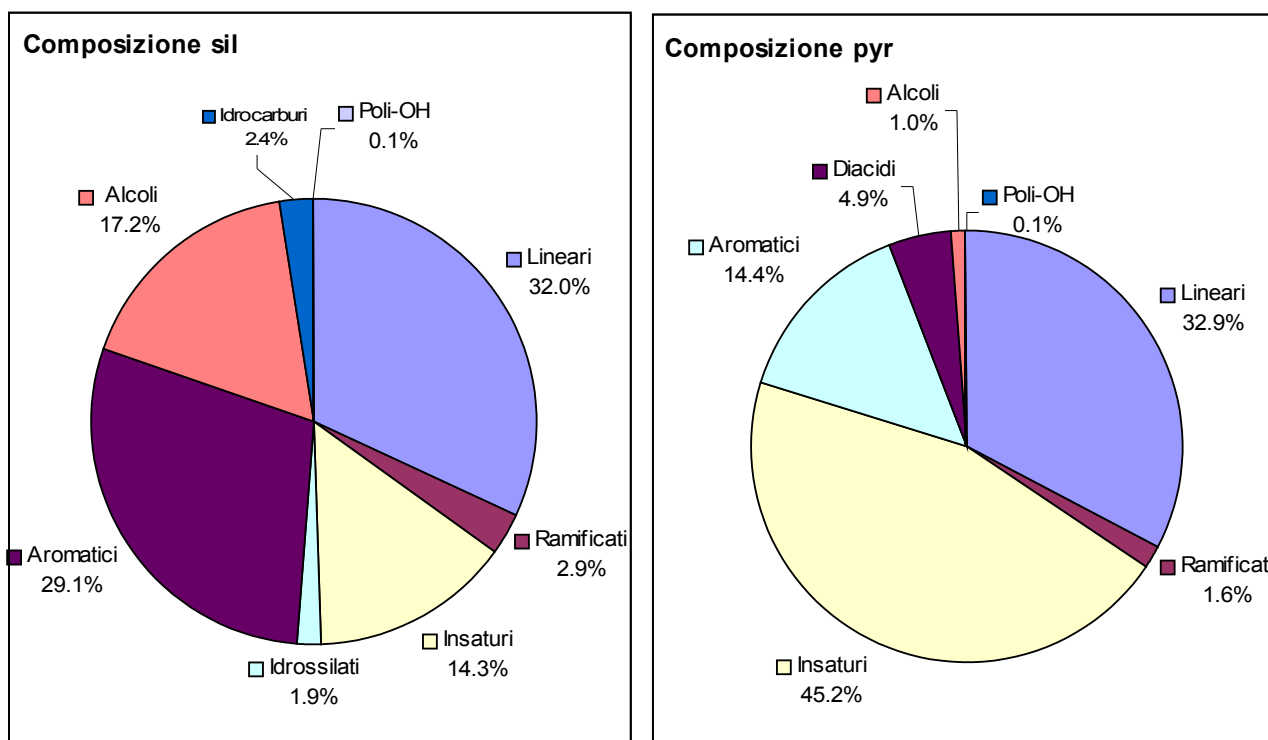
La piridina, che ha avuto un impatto notevole sulla rivelabilità delle sostanze nel campione **ORG2**, risulta ancora più efficace per **ORG3**. Rispetto al materiale iniettato lo spettrogramma ottenuto in questo modo è rappresentativo di oltre il 90% della massa iniettata (**Figura 5.25a**). Questa frazione organosolubile è evidentemente tra le più omogenee, essendo ottenuta dopo la precedente rimozione di una quantità notevole di componenti molecolari. Da questi elementi di può dedurre che la percentuale di legami esterei resistente alla reazione di metanolisi acida è piuttosto

esigua, e circoscritta a poche strutture ingombrate che liberano porzioni di materiale organico abbastanza omogeneo, e composto da molti acidi grassi saturi e insaturi, e acidi fenolici, con un minor contributo di diacidi e di altre sostanze (**Figura 5.25b**). La derivatizzazione **sil** invece non è adatta a favorire l'esposizione delle funzioni polari al reagente, e dovrebbe essere utilizzata solo per valutazioni qualitative su alcune specie meno abbondanti.

**Figura 5.24a: Confronto tra rese (%) del processo analitico GC-MS rispetto alla quantità totale di ORG3 per i metodi di derivatizzazione utilizzati**



**Figura 5.24b: Composizione molecolare (%) di ORG3 in riferimento alle categorie molecolari riscontrate nei due diversi metodi di derivatizzazione**



## 5.12 Spettroscopia NMR della componente organosolubile fortemente legata alla matrice (ORG3)

La caratterizzazione NMR del campione **ORG3** non include spettroscopia in fase solida per via della consistenza deliquescente del campione.

### 5.12.1 ORG3: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione

Il materiale fortemente legato alla matrice unica è stato ottenuto con rese modeste. Esso è rappresentativo di meno dell'1% del campione. I suoi spettri sono molto densi di segnali e correlazioni, tuttavia sono anche molto confusi per via della moltitudine dei segnali lungo l'intervallo spettrale (**Figura 5.26**). L'abbondanza delle correlazioni genera sovrapposizione che rende ardua l'assegnazione.

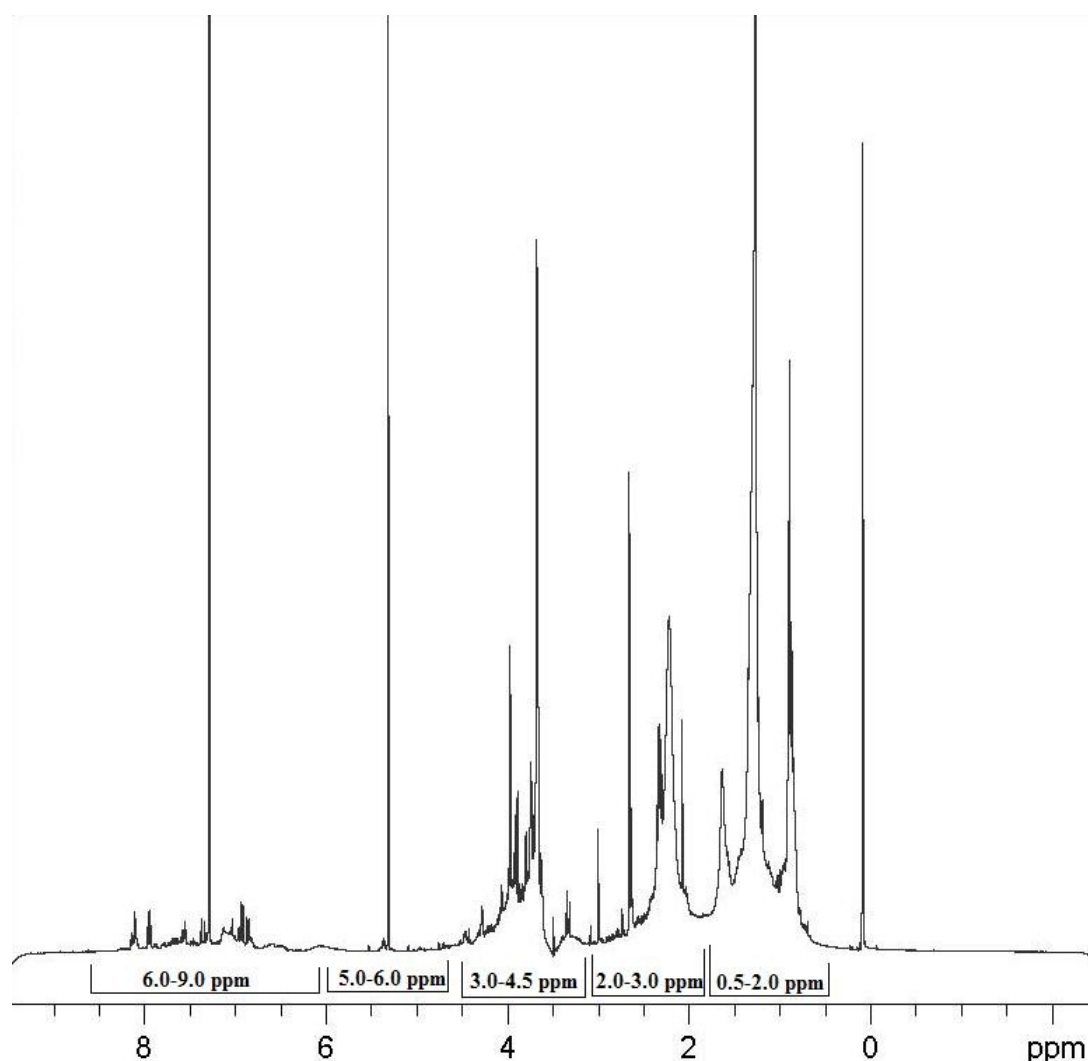
In ordine, da sinistra, si nota che la regione aromatica è molto ricca di correlazioni (6.00-9.00 ppm), la regione a campi più alti, tra 5.0 e 6.0 ppm, attribuibile agli acidi insaturi con i loro doppi legami, presenta segnali mediamente rilevanti. Più intensi e articolari, invece sono i segnali

protonici tra 3.00 e 5.00 ppm, attribuibili a gruppi idrossialchilici. Questa regione è la seconda per importanza solo alla regione alchilica (0.75-2.30 ppm), all'estremità destra dello spettro.

Dallo spettro emerge che la parte fortemente legata è un materiale meno compatto delle frazioni organosolubili trattate in precedenza. Ciò è anche in accordo con la sua consistenza deliquescente e con l'intensità dei segnali dello spettro NMR. L'intensità dei segnali dello spettro infatti è influenzata negativamente anche da fenomeni di *spin-diffusion*, che in caso di aggregazione delle sostanze sono più intensi. **ORG3** invece è caratterizzato da un'architettura supramolecolare più lassa.

I dati emersi dallo spettro NMR protonico in soluzione di **ORG3** sono quindi in accordo con l'analisi qualitativa delineata dagli esperimenti di GC-MS.

**Figura 5.26:** Spettri H NMR 1D di ORG3 in dmso d<sup>6</sup> (ppm)



### 5.12.2 ORG3: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione

Nelle **Figure 5.27a-c** sono illustrati gli spettri bidimensionali della componente organosolubile fortemente legata alla matrice.

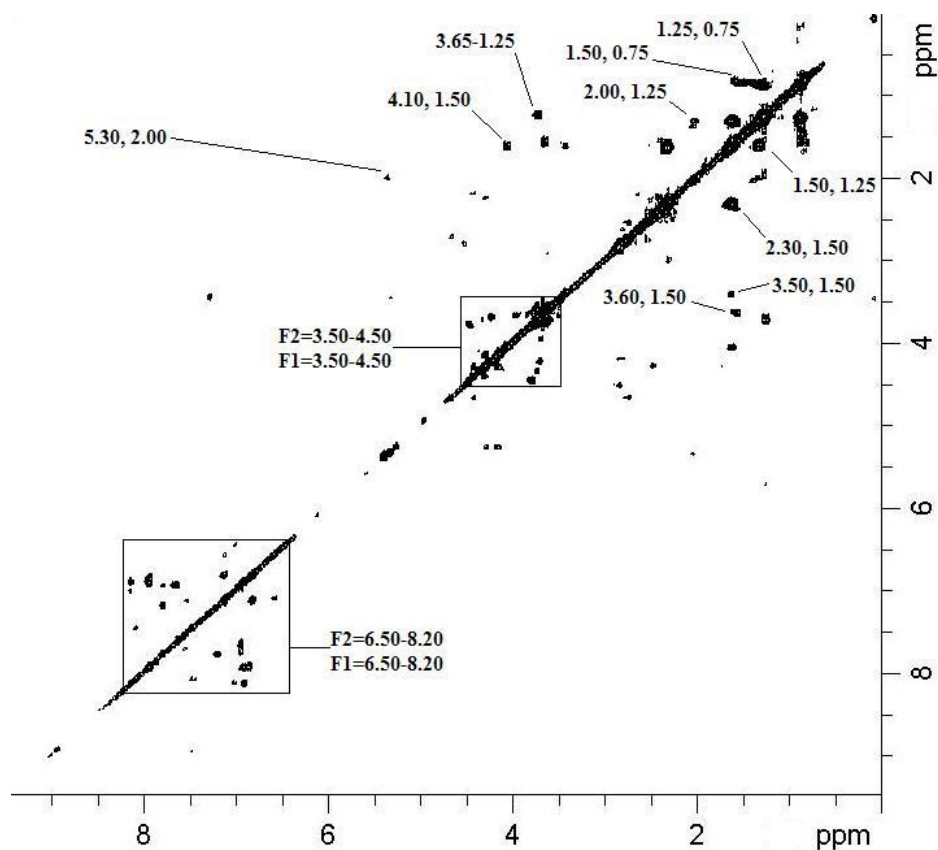
Le correlazioni HSQC del campione (**Figura 5.27c**) suggeriscono una notevole eterogeneità delle sostanze in esso presenti. Se è vero infatti che esse sono raggruppate in alcune regioni ben precise (Zona aromatica a *shift* H=6.0-9.0; C=100-150 ppm, idrossialchilica a *shift* H=3.00-4.50; C=50-75 ppm e alchilica a *shift* H=0.75-2.30; C=15-40 ppm) la molteplicità dei segnali non consente assegnazioni accurate, ma emerge comunque in generale una certa complessità di questo materiale.

Gli esperimenti di omocorrelazione COSY e TOCSY (**Figure 5.27a-b**) mostrano notevole densità di correlazioni. Esse sono infatti molto numerose intorno ad alcune regioni, nell'ordine: Zona aromatica (7.00-8.00 ppm), idrossialchilica (3.00-4.50 ppm) e alifatica (0.75-2.00 ppm) e una regione di interazione tra protoni alifatici e protoni aromatici (F2=3.00-4.50 F1=0.75-2.00 ppm). Inoltre si osserva una correlazione attribuibile a protone olefinico correlato a un segnale alchilico (5.30-2.00 ppm) indicando che anche se non molto abbondanti gli acidi insaturi sono comunque rilevanti. I valori di alcuni dei chemical shift per la regione aromatica si sovrappongono ai sistemi descritti per **ORG2**, e corrispondono al pattern di correlazione per gli acidi 4-idrossibenzoico (7.40-6.80 ppm) e 4-idrossi-3-metossibenzoico (7.80-6.80 ppm) (Paragrafo 5.7).

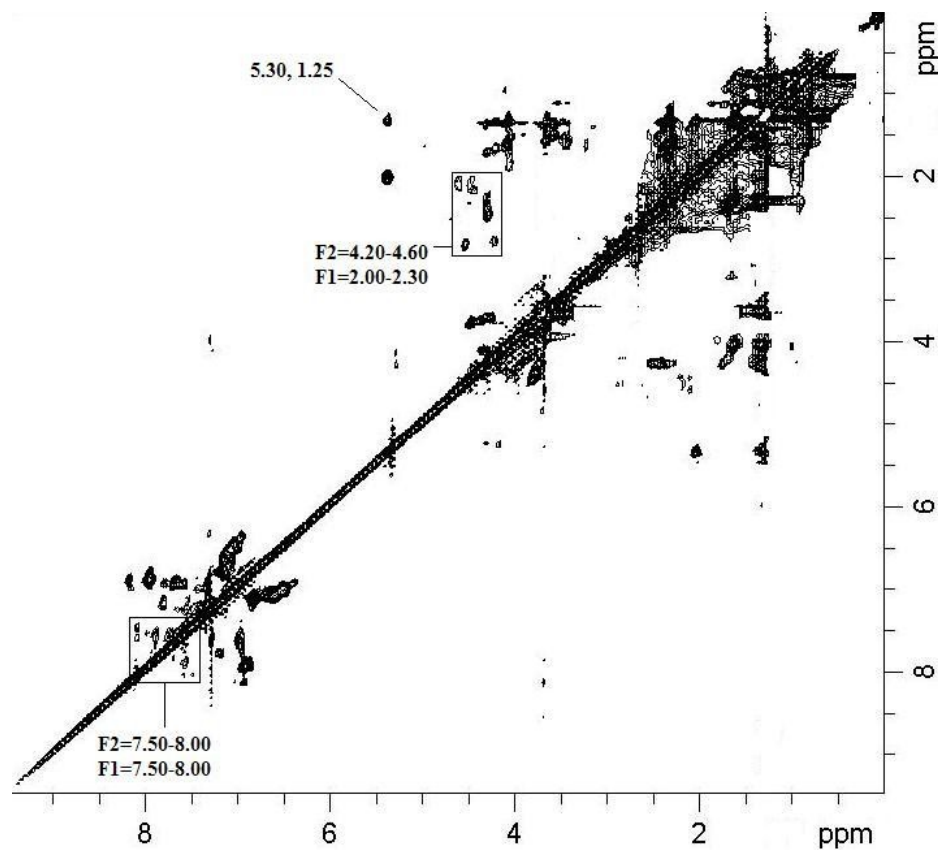
Questi dati sono riassunti nella **Tabella 5.14**. Essi indicano la presenza nella soluzione di grandi quantità di acidi lineari, alcoli, sostanze poliossidrilate e molte sostanze a struttura aromatica. Le correlazioni per queste strutture sono abbastanza dettagliate, ma a causa dell'eterogeneità della sostanza **ORG3** il tentativo di ricostruire i sistemi di spin risulta speculativo, a causa della sovrapposizione dei segnali.

**Figure 5.27a-c: Spettri NMR bidimensionali di ACQ2 in dmso-d<sup>6</sup> (ppm)**

**Figura 5.27 a: H-H COSY**

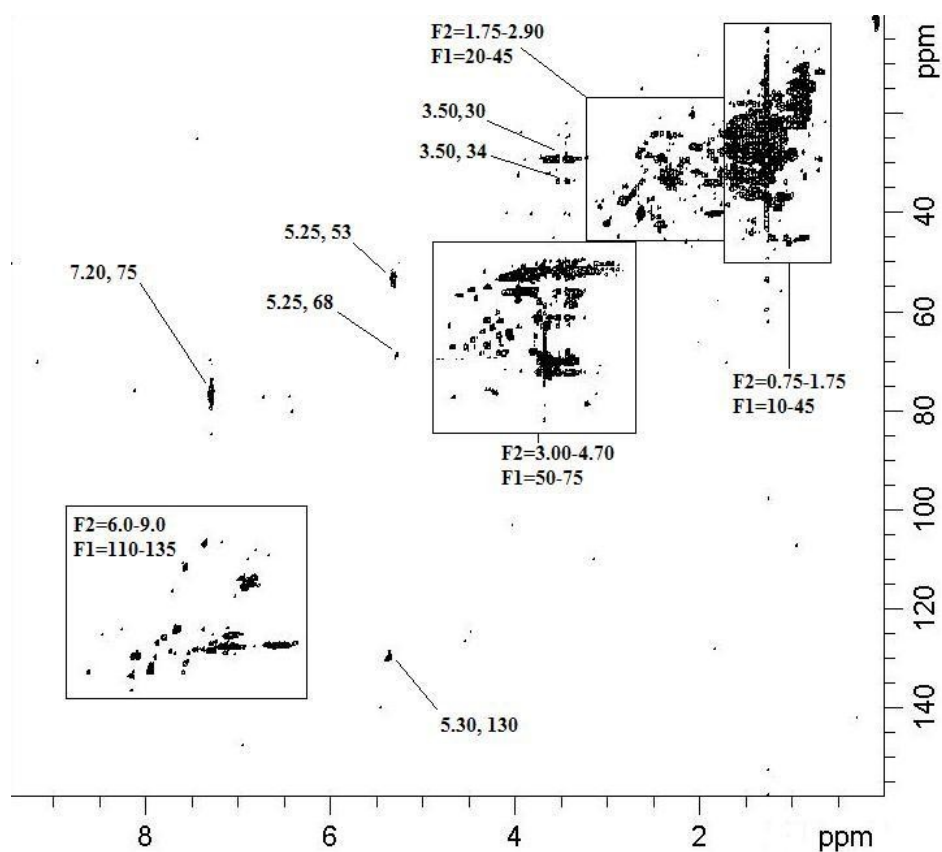


**Figura 5.27 b: H-H TOCSY**





**Figura 5.27 c: H-C HSQC**



**Tabella 5.14: Riassunto delle correlazioni bidimensionali in ORG3 (F2= $^1\text{H}$ , F1= $^{13}\text{C}$ , ppm)**

$J_{\text{H-C}}^1$	$J_{\text{H-H}}^{2-3}$	$J_{\text{H-H}}^{\text{long range}}$
F2, F1	F2, F1	F2, F1
6.0-9.0, 110-135	6.50-8.20, 6.50-8.20	7.50-8.00, 7.50-8.00
7.20, 75	5.30, 2.00	5.30, 1.25
5.30, 130	3.50-4.50, 3.50-4.50	4.20-4.60, 2.00-2.30
5.25, 68	4.10, 1.50	4.10, 1.25
5.25, 53	3.65, 1.25	3.65, 1.50
3.00-4.70, 50-75	3.60, 1.50	2.30, 1.25
3.50, 34	3.50, 1.50	
3.50, 30	2.30, 1.50	
1.75-2.90, 20-45	2.00, 1.25	
0.75-1.75, 10-45	1.50, 1.25	
	1.50, 0.75	
	1.25, 0.75	

### 5.13 Analisi MS di residuo finale di frazionamento (RES4)

#### 5.13.1 Aspetto generale

Il residuo del frazionamento è stato analizzato sotto il profilo di HPSEC-ESI-Orpitrapp-MS come tale e come prodotti di frazionamento HPSEC preparativo (Fraz. 1-10).

Il confronto tra il materiale **RES4** e le sue frazioni è riassunto in **Figura 5.28**. Gli spettrogrammi mostrano che nelle frazioni a più basso tempo di eluizione (ovvero alto raggio idrodinamico) separate precedentemente con HPSEC *offline*, sono prevalenti quei segnali a cui corrisponde un basso tempo di eluizione anche nella corsa *online*, e lo stesso fenomeno, ma con andamento opposto, si osserva per le frazioni a più alto tempo di eluizione. La separazione preparativa lascia nelle frazioni centrali, nonostante la dialisi, un'impurezza di fosfati che si manifesta come un ulteriore picco intermedio. La magnitudine del picco è dovuta alla maggiore rivelabilità di queste specie con la tecnica impiegata, più che a un contributo gravimetricamente apprezzabile.

#### 5.13.2 RES4: LC-MS, Analisi qualitativa

Il materiale **RES4** e le sue frazioni non differiscono in modo sostanziale per quanto concerne le molecole che le costituiscono, pertanto la descrizione delle componenti è la medesima per tutte le frazioni.

Gli acidi grassi lineari sono una componente fondamentale delle sostanze umiche, e anche il residuo in analisi non fa eccezione. Sono presenti acidi a numero pari di atomi di carbonio di lunghezza variabile da dieci a diciotto atomi di carbonio. L'analisi degli acidi grassi in campioni di origine naturale attraverso la spettrometria di massa ESI è una tecnica di analisi di recente applicazione (Qian *et al.*, 2008).

Gli acidi grassi con ramificazione di tipo iso e anteiso sono di origine batterica (Kuneda, 1991) e sono presenti in tutti i campioni esaminati. La tecnica di spettrometria di massa in uso tuttavia non permette di distinguere tra isomeri. Sono presenti acidi grassi a quindici e diciassette atomi di carbonio.

Gli acidi grassi insaturi sono presenti nei campioni esaminati nelle varianti a quattordici, sedici e diciotto atomi di carbonio, essi presentano un'unica ramificazione, di cui non è possibile determinare la posizione, anche se non è da escludere l'ipotesi che si tratti di una miscela di isomeri in quanto il doppio legame è solito migrare in condizioni di pH estremamente acido. Gli acidi insaturi potrebbero anche essersi originati da disidratazione di un idrossiacido precursore.

Altri acidi di non precisata struttura sono stati riscontrati nel campione in analisi, essi presentano, in base alla formula bruta, un numero di ossidrili variabile tra uno e quattro, un numero di carboni variabile tra sei e ventuno, e, in base all'indice di insaturazione, uno o più doppi legami. Benchè non sia possibile escludere che si tratti di chetoacidi, i dati di NMR (discussi in seguito) non sono in accordo con tale ipotesi. Per alcuni acidi è stato possibile, in base a valutazioni di spettrometria di massa/massa ( $MS^2$  o tandem), assegnare la struttura in modo inequivocabile, mentre per acidi più complessi l'attribuzione non è stata possibile. La possibilità che si tratti di miscele di isomeri aggiunge un ulteriore livello di incertezza nell'attribuzione. In un caso, è stato riscontrata una formula bruta corrispondente a un composto contenente due atomi di azoto, tuttavia tale composto è ai limiti della rivelabilità dello strumento e pertanto non è stato possibile approfondire ulteriormente la sua struttura.

Alcuni composti ciclici sono stati identificati negli spettri di massa, in particolare l'acido benzoico, facilmente identificabile dalla sua formula bruta, è il più importante, altri due sono stati classificati in base alla loro formula bruta e al loro indice di insaturazione. A causa della loro refrattarietà a rilasciare frammenti utili alla definizione della struttura, è possibile solo fare alcune

ipotesi sulla costituzione. La **Figura 5.28** illustra in dettaglio i cromatogrammi delle frazioni e del materiale di riferimento **RES4**.

La **Figura 5.29a-d** mostra alcuni spettri MS<sup>2</sup> con l'assegnazione dei picchi proposta. Nel caso del composto 129, la formula di struttura determina la presenza di due insaturazioni e tre atomi di ossigeno da assegnare. Il frammento 59 è tipico di acidi carbossilici alchilici senza ramificazioni sul carbonio in posizione alfa. La funzione carbossilica richiede un'insaturazione e due atomi di ossigeno. La perdita di acqua (frammento M-18) indica che deve essere presente una funzione alcolica. Questo esclude che la seconda insaturazione possa essere di natura chetonica. La perdita di anidride carbonica non fornisce informazioni supplementari, mentre la scissione con perdita di 70 dalton avviene necessariamente al centro della catena. Pertanto sia l'insaturazione che l'ossidrile non possono coinvolgere il carbonio 3, perché ciò originerebbe frammenti di altro peso. L'ossidrile è quindi assegnato alla posizione 4, con il doppio legame tra i carboni 5 e 6, poiché le altre combinazioni non soddisfano il criterio necessario alla perdita d'acqua e cioè di avere un idrogeno adiacente all'ossidrile perché avvenga la disidratazione.

Ben più difficile è invece l'assegnazione delle molecole 141, 155 e 217, in quanto esse presentano poche frammentazioni e scarsamente informative. In tali casi quindi si tratta di formule brute solamente proposte. Partendo dalle funzioni certamente presenti, come nel caso dei frammenti 59 (RCH<sub>2</sub>COOH) o M-42 (RCH<sub>2</sub>OH), tenendo conto di eventuale disidratazioni o decarbossilazioni (M-18 ed M-44) si è costretti ad arrangiare gli atomi restanti nel modo più ordinato possibile. In questi casi il fenomeno dell'isomeria aumenta le combinazioni oltre le possibilità del metodo' poiché non è ragionevolmente possibile isolare le specie in questione.

#### *5.13.3 RES4: LC-MS, Tempi di eluizione delle molecole*

Le diverse molecole costituenti la sostanza organica in studio hanno ciascuna un'interazione differente con la fase stazionaria della colonna. Questo non solo ne facilita la caratterizzazione, ma

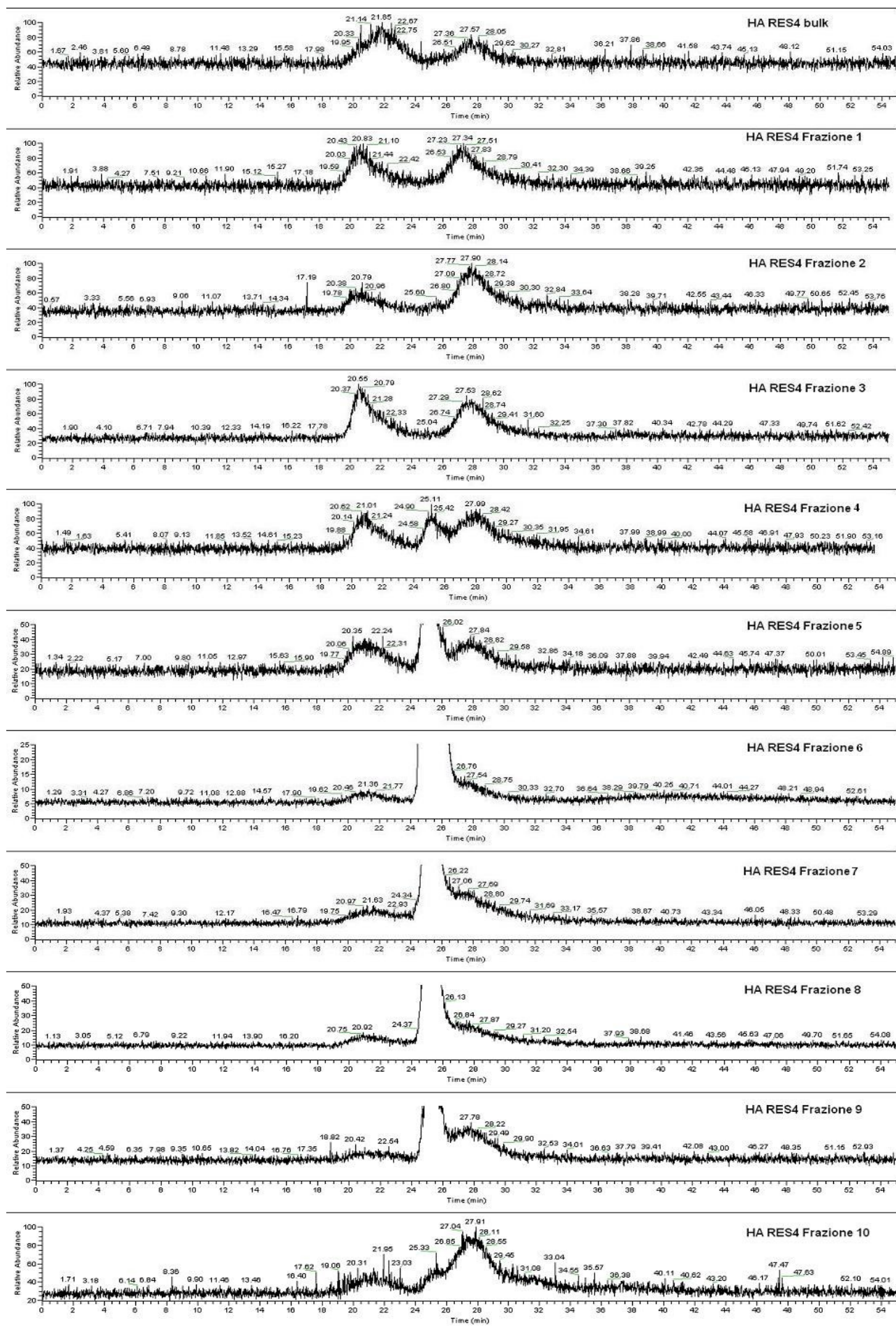
fornisce anche informazioni sull'organizzazione molecolare. E' probabile che le specie eluiscano come aggregati, i quali siano poi progressivamente dispersi. La dispersione produce alcune molecole isolate che hanno interazioni anche in funzione dell'affinità con la fase stazionaria. Sebbene la maggioranza delle specie sia attribuibile a uno dei due picchi più grandi, ci sono eccezioni, in particolare l'acido benzoico e i composti aromatici 141 e 155 si discostano significativamente. La sostanza con m/z 217 viceversa è rivelabile poco dopo i 20 minuti. I piccoli acidi idrossiinsaturi m/z 129 e 143 sono lievemente anticipati (23 minuti). Tutti gli altri oscillano tra i 25 e i 27 minuti.

La **Tabella 5.16** mostra le attribuzioni dei principali componenti dell'HA-VICO con i rispettivi tempi medi di ritenzione.

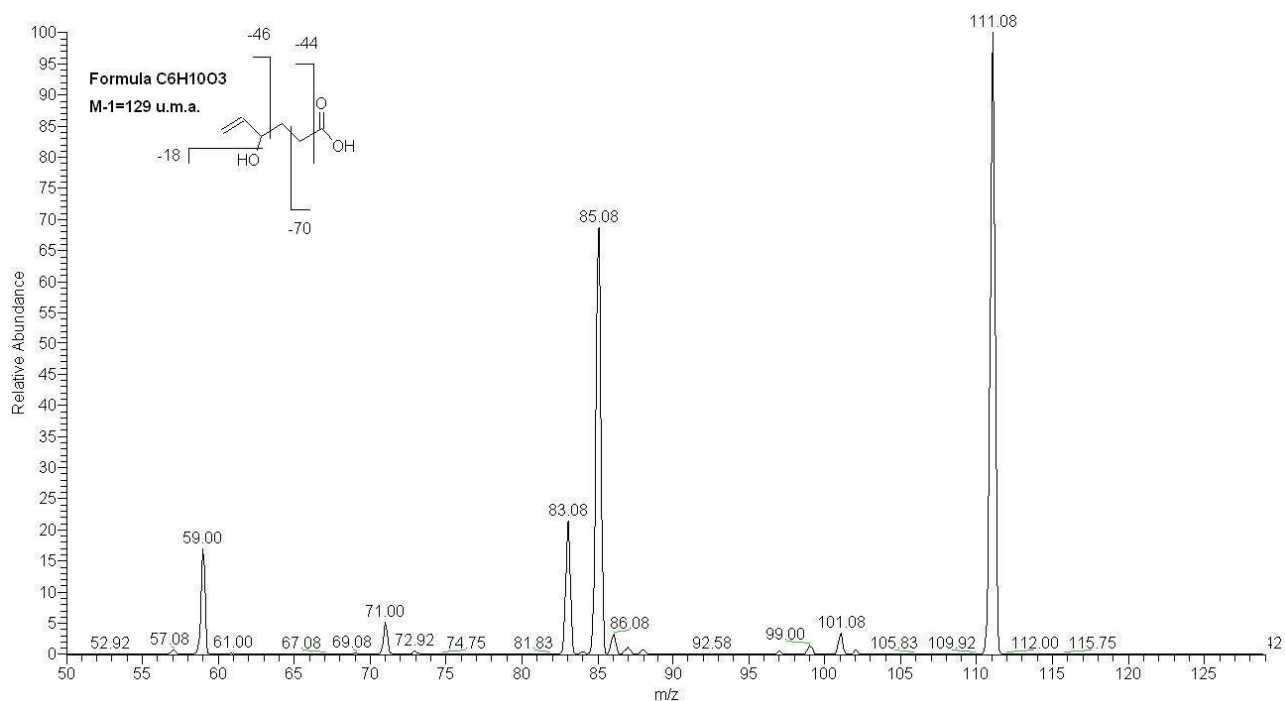
**Tabella 5.16: tempi medi di ritenzione (min) dei principali composti rivelati per HPSEC-MS**

Composto	Tempo di ritenzione	Composto	Tempo di ritenzione
Ac. Decanoico	26-28	C15H22O4	24-25
Ac. Dodecanoico	26-28	C17H26O4	25-26
Ac. Tetradecanoico	26-28	C17H26O5	25-26
Ac. Pentadecanoico	26-28	C18H34O3	25-26
Ac. Esadecanoico	26-28	C18H34O4	25-26
Ac. Eptadecanoico	26-28	C18H36O4	26-28
Ac. Ottadecanoico	26-28	C18H34O5	25-26
		C19H30O5	25-26
		C19H28O4N2	25-26
		C19H30O6	25-26
Ac. Tetradecenoico	26-28	C20H24O3	25-26
Ac. Esadecenoico	26-28	C21H26O3	25-26
Ac. Ottadecenoico	26-28	C21H34O6	25-26
		C6H6O4	45+
		Ac. Benzoico	45+
Ac. Idrossiesenoico	22-24	C6H4O5	45+
Ac. Idrossieptenoico	22-24	C7H6O8	21-22

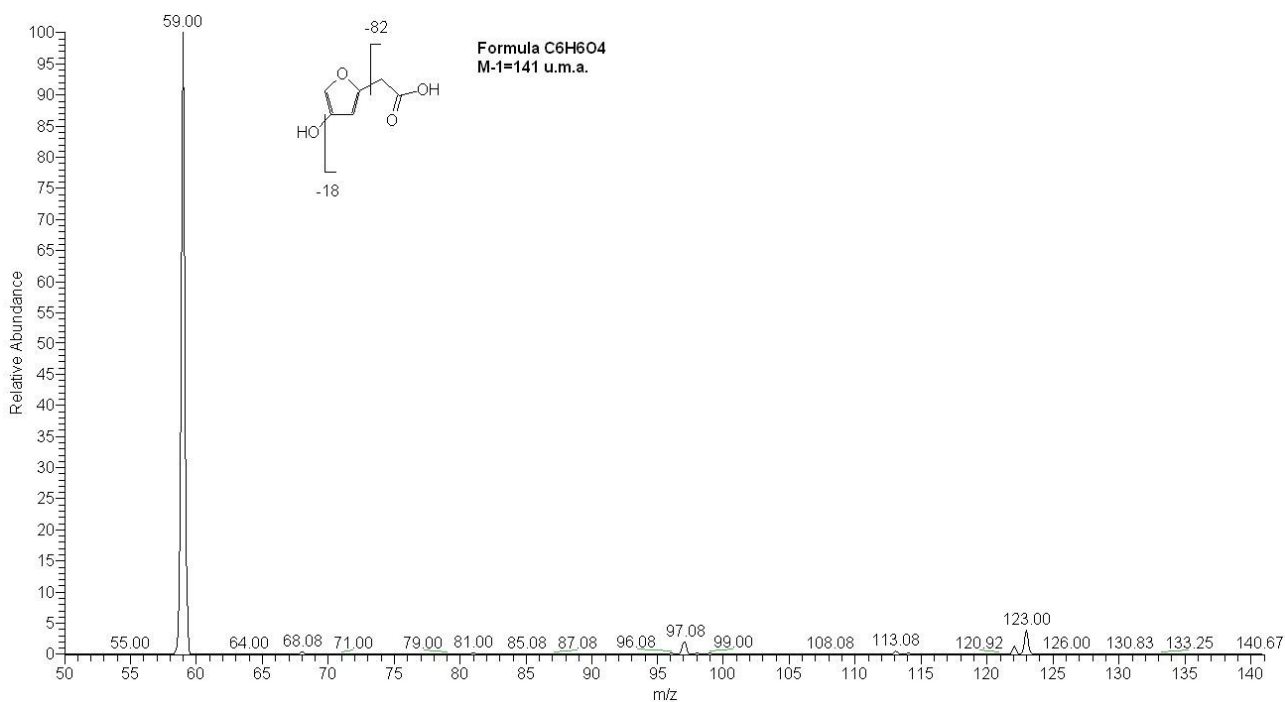
**Figura 5.28: Raffronto tra cromatogrammi HPSEC.Orbitrap di RES4 e frazioni**



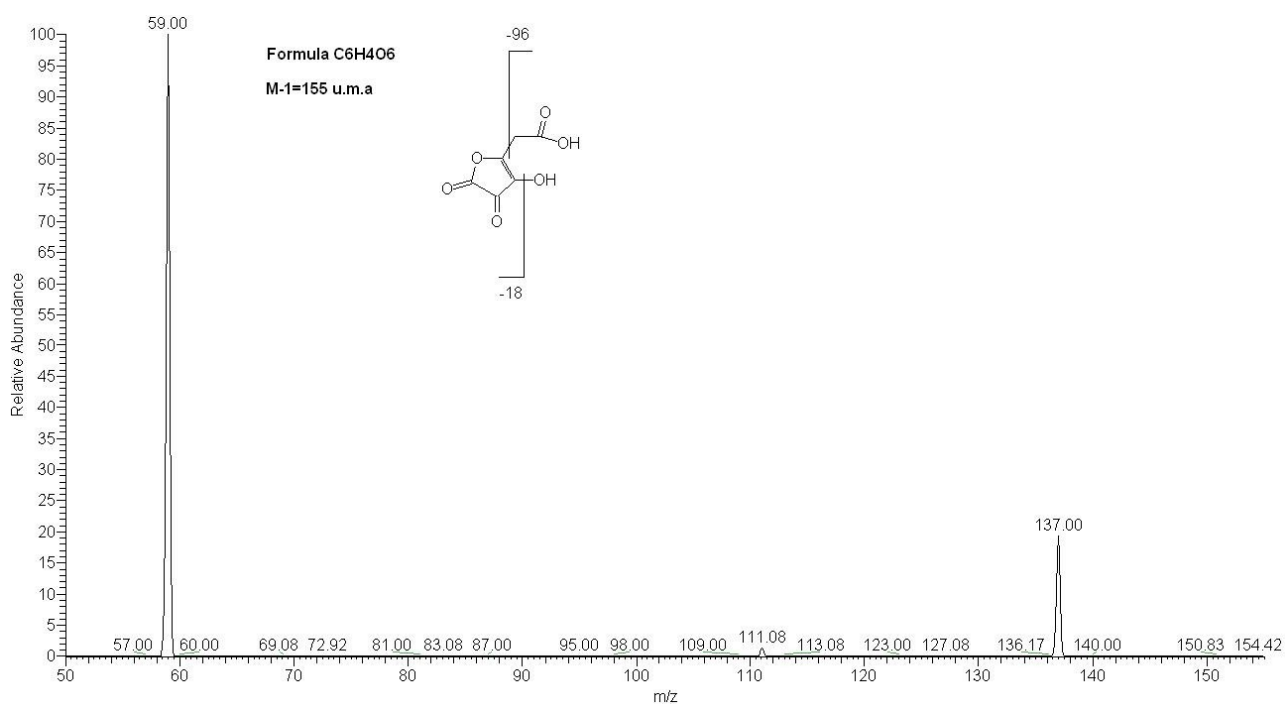
**Figura 5.29a: Interpretazione strutturale del picco m/z 129**



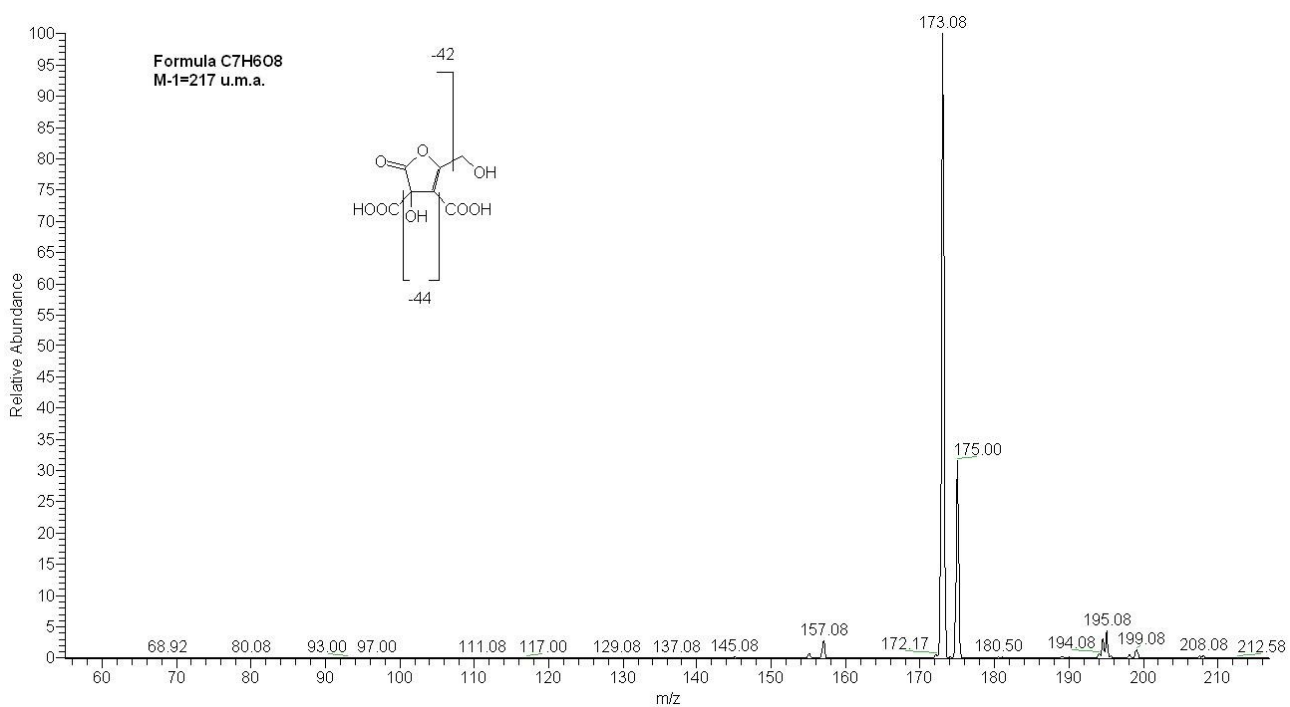
**Figura 5.29b: Interpretazione strutturale del picco m/z 141**



**Figura 5.29c: Interpretazione strutturale del picco m/z 155**



**Figura 5.29d: Interpretazione strutturale del picco m/z 217**





#### 5.13.4 RES4: LC-MS, Caratterizzazione quantitativa delle frazioni

I risultati quantitativi per le molecole riscontrate nei campioni analizzati sono riassunti nella **Tabella 5.17a-d**. Il composto ciclico con m/z 141 è stato omesso in quanto la sua risposta allo strumento è di molti ordini di grandezza superiore alla norma e questo produce aberrazioni nella stima delle rese per tutti gli altri composti.

**Tabella 5.17a: Risultati quantitativi (µg/g di campione) dell'analisi HPSEC-Orbitrap-ESI-MS di HA RES4 con deviazioni standard percentuali (Acidi saturi)**

Frazione	Ac. Decanoico	Ac. Dodecanoico	Ac. Tetradecanoico	Ac. Pentadecanoico	Ac. Esadecanoico	Ac. Eptadecanoico	Ac. Ottadecanoico
Bulk	76,6	47,7	178,7	191,2	324,0	24,9	8,3
dev.st. %	14,74	45,18	21,99	0,57	36,46	35,14	42,69
Frazione 1	17,7	26,6	255,5	388,7	999,6	144,2	121,7
dev.st. %	35,56	1,49	0,34	10,69	23,40	47,49	33,16
Frazione 2	22,7	28,7	298,1	410,8	1190,6	242,3	145,2
dev.st. %	12,70	34,66	14,26	15,43	13,94	5,71	15,62
Frazione 3	26,5	34,9	289,1	317,1	655,3	97,6	104,3
dev.st. %	19,62	11,12	30,52	50,92	12,63	40,21	3,68
Frazione 4	35,3	47,3	146,1	430,7	908,1	132,1	421,8
dev.st. %	2,23	65,02	73,23	51,86	19,63	53,88	26,78
Frazione 5	28,3	32,8	187,0	229,7	341,3	57,2	25,4
dev.st. %	7,50	24,49	1,63	15,25	5,59	19,19	9,64
Frazione 6	33,6	82,8	667,4	790,9	783,7	178,6	67,0
dev.st. %	3,78	47,26	66,94	55,40	20,53	43,35	37,17
Frazione 7	31,4	53,9	484,0	544,5	896,0	143,2	160,4
dev.st. %	16,98	12,96	4,26	21,32	12,65	26,93	39,09
Frazione 8	36,9	40,4	266,0	229,3	449,9	53,0	49,9
dev.st. %	18,09	32,67	10,12	31,87	19,21	5,19	15,21
Frazione 9	45,2	61,3	343,2	371,5	467,7	96,0	59,2
dev.st. %	6,84	20,94	12,86	16,27	5,27	42,00	13,07
Frazione 10	201,0	102,8	607,4	399,7	1090,5	133,7	99,0
dev.st. %	5,18	25,27	48,15	1,65	18,25	44,68	21,08

**Tabella 5.17b: Risultati quantitativi ( $\mu\text{g/g}$  di campione) dell'analisi HPSEC-Orbitrap-ESI-MS di HA RES4 con deviazioni standard percentuali (Acidi insaturi e idrossi-insaturi)**

Frazione	Ac. Tetradecenoico	Ac. Esadecenoico	Ac. Ottadecenoico	Ac. Idrossiesenoico	Ac. Idrossieptenoico
Bulk	46,5	325,8	59,0	33,0	22,8
dev.st. %	7,72	0,53	32,32	7,85	2,84
Frazione 1	37,3	537,0	340,5	15,0	16,5
dev.st. %	33,47	7,85	35,67	10,37	10,16
Frazione 2	51,7	707,9	713,3	23,5	27,6
dev.st. %	19,87	3,40	3,37	16,00	17,98
Frazione 3	64,3	827,8	422,6	23,9	12,6
dev.st. %	61,62	64,25	36,69	5,52	1,53
Frazione 4	80,0	1032,2	1309,8	37,7	32,7
dev.st. %	83,56	80,17	10,59	27,65	0,55
Frazione 5	36,2	518,3	167,7	57,7	35,2
dev.st. %	23,82	30,81	7,99	13,72	21,88
Frazione 6	168,4	2053,7	506,5	34,4	38,0
dev.st. %	87,46	76,04	40,00	9,20	2,37
Frazione 7	106,1	1290,0	415,2	65,0	41,9
dev.st. %	38,97	40,98	17,05	16,28	10,23
Frazione 8	52,6	496,4	150,4	31,5	27,4
dev.st. %	60,11	28,62	32,32	12,83	8,65
Frazione 9	98,1	1034,6	678,1	46,2	21,3
dev.st. %	15,72	6,01	24,36	18,44	40,81
Frazione 10	117,1	898,7	624,5	175,9	93,0
dev.st. %	33,63	5,22	43,01	17,17	37,23

**Tabella 5.17c: Risultati quantitativi (µg/g di campione) dell'analisi HPSEC-Orbitrap-ESI-MS di HA RES4 (Altri acidi) con deviazioni standard percentuali (N/A in mancanza di replicati)**

Frazione	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>
Bulk	38,9	13,3	18,9	22,5	21,7	4,2	4,4	1,6
dev.st. %	N/A	N/A	N/A	24,78	N/A	N/A	N/A	N/A
Frazione 1	22,4	60,2	12,0	46,2	9,3	33,1	31,3	27,5
dev.st. %	5,40	0,50	29,17	10,30	1,85	18,55	13,20	19,93
Frazione 2	23,6	20,9	9,3	21,3	5,4	8,1	3,9	10,0
dev.st. %	11,18	39,47	21,51	46,62	7,10	6,23	36,03	15,27
Frazione 3	11,8	43,6	6,4	49,7	8,5	7,5	3,1	8,3
dev.st. %	28,26	5,52	2,19	26,27	20,53	43,31	15,61	1,07
Frazione 4	73,4	36,9	39,7	71,5	12,9	42,6	125,0	9,5
dev.st. %	21,56	2,56	6,48	16,89	63,59	5,61	0,58	2,62
Frazione 5	67,4	40,8	35,8	29,4	3,1	1,8	2,0	18,8
dev.st. %	35,59	11,38	2,12	13,34	75,34	0,11	11,05	50,87
Frazione 6	186,4	58,5	65,0	48,7	13,9	6,8	1,3	22,8
dev.st. %	14,80	9,40	3,80	95,88	78,71	34,17	0,34	34,00
Frazione 7	368,0	449,8	232,8	41,2	11,6	4,7	2,6	391,1
dev.st. %	4,66	3,99	2,37	28,88	35,49	31,26	42,55	0,61
Frazione 8	71,0	162,5	58,8	18,3	5,9	3,1	2,3	8,8
dev.st. %	3,22	14,88	2,35	38,69	58,99	17,46	80,41	29,16
Frazione 9	216,8	153,8	103,0	105,5	22,8	22,1	51,2	102,7
dev.st. %	12,88	18,80	9,97	7,08	23,00	37,22	14,67	27,22
Frazione 10	426,0	110,8	79,5	242,9	16,2	26,8	34,2	11,8
dev.st. %	3,01	2,03	24,21	81,61	34,37	45,99	69,28	32,45

**Tabella 5.17d: Risultati quantitativi ( $\mu\text{g/g}$  di campione) dell'analisi HPSEC-Orbitrap-ESI-MS di HA RES4 (Altri acidi) con deviazioni standard percentuali (N/A in mancanza di replicati o in assenza del composto)**

Frazione	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_2$	$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_6$	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_3$	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_3$	$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_6$	Ac. Benzoico	$\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_5$	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_8$
Bulk	0,0	7,9	9,4	7,9	0,0	4336,8	7888,0	9158,0
dev.st. %	N/A	N/A	41,06	25,32	N/A	11,32	4,63	6,11
Frazione 1	7,0	6,7	24,8	19,4	14,6	16336,7	27484,6	11842,6
dev.st. %	18,54	12,28	5,21	42,79	5,38	18,94	53,93	4,63
Frazione 2	0,0	6,7	20,9	15,5	2,9	17068,3	9568,1	9711,5
dev.st. %	N/A	44,51	4,16	0,63	N/A	19,71	16,81	5,49
Frazione 3	0,0	2,4	8,2	3,0	3,3	19570,4	54330,1	65224,2
dev.st. %	N/A	3,10	15,20	7,70	23,46	0,23	15,88	12,16
Frazione 4	5,4	22,5	6,2	3,6	2,6	10345,7	28015,7	16093,2
dev.st. %	16,08	2,35	0,20	10,53	67,53	8,14	4,90	54,62
Frazione 5	0,0	24,8	4,4	2,1	11,6	9587,5	19636,0	9249,5
dev.st. %	N/A	1,18	4,20	44,39	8,26	5,78	8,47	16,43
Frazione 6	0,0	53,8	8,4	5,3	7,9	12093,6	23654,2	9092,5
dev.st. %	N/A	29,76	21,93	75,67	75,00	4,24	11,92	4,08
Frazione 7	0,0	256,4	23,5	11,7	264,8	14422,9	24775,8	7834,4
dev.st. %	N/A	7,19	13,79	28,39	2,88	13,98	1,31	3,31
Frazione 8	2,1	26,0	5,5	3,1	3,9	47210,4	55316,2	8826,7
dev.st. %	20,91	13,35	57,90	3,11	66,99	1,43	6,19	4,35
Frazione 9	6,7	124,9	29,3	14,6	67,3	12619,5	18970,0	5427,1
dev.st. %	34,44	13,63	29,79	23,51	12,30	4,50	11,16	10,85
Frazione 10	4,4	52,0	29,7	15,9	6,5	34382,7	53960,2	3518,5
dev.st. %	N/A	37,36	37,59	41,30	59,95	9,03	11,26	0,59

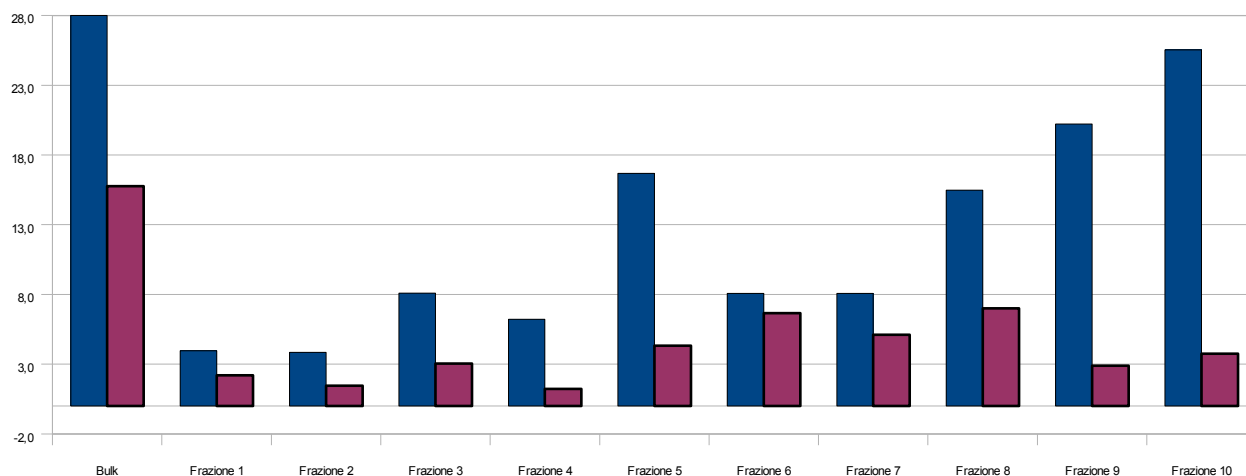
La trattazione quantitativa dei dati inerenti alle sostanze in analisi risente della scarsa riproducibilità che spesso accompagna le misure di massa delle componenti molecolari delle HS. Tuttavia per molti composti i livelli di incertezza su 3 repliche sono accettabili (dev. st.<15%), indicando una certa validità del metodo.

I composti più abbondanti sono le molecole a struttura ciclica, con il caso limite della sostanza m/z 141 la cui misura quantitativa supera di molti ordini di grandezza la quantità iniettata. Questa sostanza è evidentemente fuori dai limiti della taratura del metodo. Le sostanze lineari

invece hanno struttura molto varia ma nella maggior parte dei casi si limitano ad essere presenti in tracce, spesso ai limiti della rivelabilità strumentale. Ciò è probabilmente dovuto allo stato di ossidazione piuttosto avanzato che caratterizza le sostanze cicliche, mentre i composti lineari sono esposti a ossidazioni e disidratazioni.

Un dato importante che emerge dalla **Tabella 5.17a-d** è l'aumento di risposta delle molecole presenti nelle frazioni separate per HPSEC rispetto al materiale unico intero. Evidentemente la separazione HPSEC preparativa ha permesso alle molecole di separarsi e riorganizzarsi in un'architettura più regolare e più facilmente disperdibile nella successiva analisi ifenata HPSEC-MS. Questo dato è in accordo con dati di GC-MS riportati in precedenza per le frazioni organiche dello stesso HA-VICO dopo separazione con HPSEC preparativo (Baiano, 2006).

**Figura 5.30:** Indice C10/C18(in blu) e C14:1/C18:1 (in viola) per RES4 e relative frazioni (scala arbitraria)



La composizione quantitativa inoltre differenzia le frazioni a diverso raggio idrodinamico, come è evidenziato in **Figura 5.30** per confronto dei rapporti delle quantità ottenute per acidi a catena lunga e per gli omologhi inferiori. Gli acidi grassi lineari a lunga catena sembrano essere più rappresentati nelle frazioni **1-4**, meno nelle frazioni **5-6**. Questo dato è inteso come rapporto tra quantità di acidi decanoico/ottadecanoico per ciascun campione. L'andamento per gli acidi insaturi,

inteso come rapporto delle quantità degli acidi tetradecenoico/ottadecenoico indica che per questa categoria di sostanze le frazioni centrali le frazioni (**5-8**) sono più rappresentate da omologhi a lunga catena. Il dato anomalo per il materiale bulk è probabilmente dovuto alla diversa risposta strumentale rispetto al materiale frazionato in HPSEC.

Come ci si aspetterebbe da un materiale dotato di assorbanza così intensa e sottoposto a numerose scissioni di legami deboli, il materiale **RES4**, così come le sue frazioni, è caratterizzato da un materiale fortemente ossidato e ricco di legami  $\pi$ , con contributo minore di materiale alifatico, olefinico, o idrossialchilico. La trattazione dei dati in tabella, illustrata graficamente in **Figura 5.31a-d**, ha prodotto risultati in linea con la teoria. Il materiale organico, per quella parte sensibile alla caratterizzazione strumentale, è composto per la maggior parte da materiale ciclico ossigenato, e in misura molto minore da specie a struttura lineare.

#### 5.13.5 RES4: LC-MS, Rese quantitative analitiche strumentali

Un fattore importante per determinare l'efficacia del metodo è la sua capacità di caratterizzare una grande quantità maggiore sostanza molecole uniche. Normalmente, in metodi GC-MS su frazioni riportati in letteratura (Fiorentino, 2004; Baiano, 2006) la sommatoria di tutti i dati gravimetrici non corrisponde al peso della quantità di sostanza unica impiegata. L'eterogeneità degli analiti è sicuramente responsabile di questo fenomeno che costituisce un limite per la costruzione di librerie umeomiche.

In **Figura 5.31a** sono rappresentate in diagramma le rese analitiche rispetto al materiale iniettato. Il dato che emerge è la caratteristica delle HS di aumentare la risposta strumentale in seguito a un frazionamento. Il materiale bulk **RES4** infatti ha la resa più bassa (2%) rispetto alle sue frazioni (4-14%).

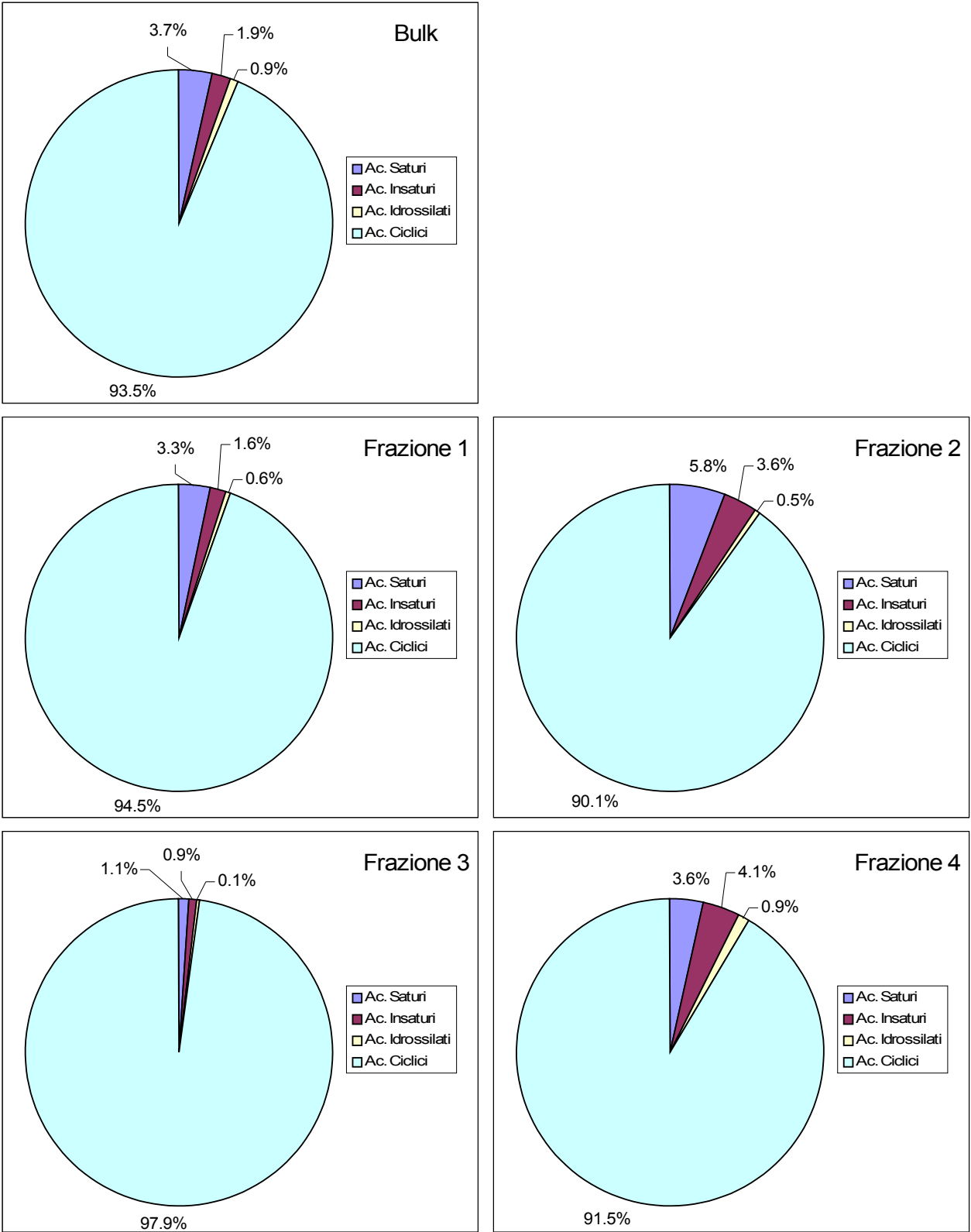
La tecnica di spettrometria di massa ESI ha comunque il limite di poter rilevare esclusivamente molecole ionizzabili, pertanto una parte del materiale è intrinsecamente in difetto rispetto all'iniezione.

Questo limite, tuttavia, non è attribuibile unicamente a un limite squisitamente strumentale. L'analisi delle miscele eterogenee infatti è sempre stata limitata da fenomeni di interazione tra molecole. L'eterogeneità infatti aumenta la probabilità che una data molecola svolga un effetto interferente per la misurazione di un'altra specie. Nel caso della ESI-MS, in particolare, possono influenzare negativamente fenomeni di aggregazione tra molecole, di mancata espulsione delle specie cariche dalle gocce nebulizzate, di interferenza dovuta a impurezze inorganiche o di saturazione del rivelatore per superamento del limite di rivelabilità. Le HS, per loro natura, si prestano a tutti i casi menzionati. La riprova di ciò è data dall'osservazione della differenza di risposta strumentale degli standard esterni rispetto agli standard interni. In **Figura 5.32a-b** sono confrontate le aree sottese ai picchi per gli standards relativi alle sostanze lineari (Ac. esadecanoico d-3 e acido 4-idrossibenzoico  $^{13}\text{C}$ -6). Tali sostanze, inoculate dall'esterno, subiscono una modifica della risposta strumentale. L'acido ciclico (4-idrossibenzoico) sembra risentire dell'effetto dell'inoculo ma la sua risposta cambia poco con il variare del tempo, mentre lo standard per le specie lineari subisce un'ulteriore smorzamento della risposta col variare del tempo. Inoltre, tale effetto è influenzato dalla composizione chimica del campione di HA. Infatti soluzioni di **RES0** e **ACQ2** hanno un effetto più pronunciato rispetto a **RES4**, il quale invece non produce effetti significativi sulla molecola lineare se non in tempi lunghi. Per quanto riguarda **RES0**, questo effetto è attribuibile alla maggiore complessità molecolare dell'HA di partenza rispetto al più impoverito **RES4**, mentre il maggiormente idrofilo **ACQ2**, ha una probabile maggiore interazione preferenziale all'interfaccia di vaporizzazione Elettrospray rispetto agli standard di natura lipofila. Il contatto con le sostanze umiche favorisce quindi l'incorporazione di molecole esogene, in particolar modo quelle

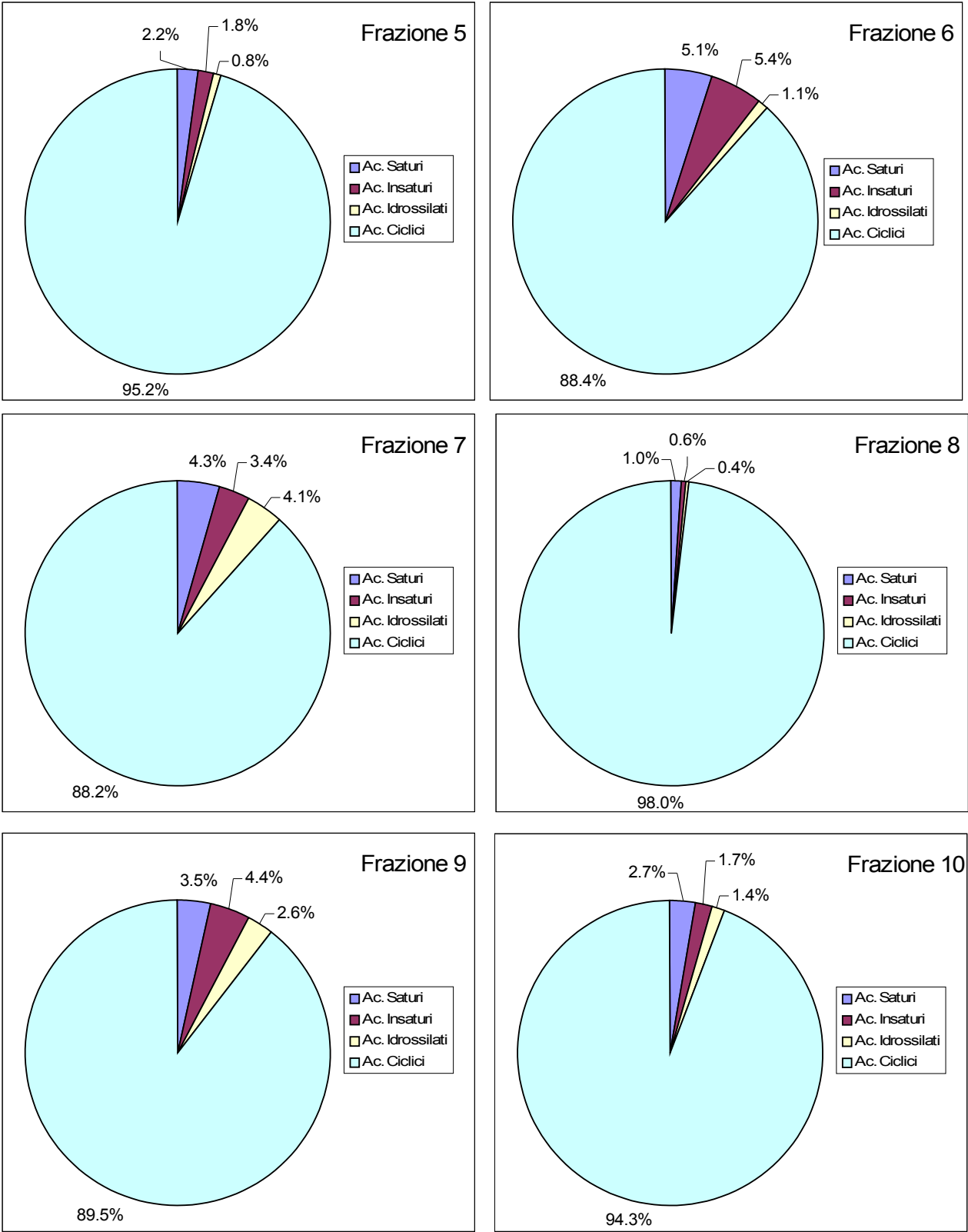
in grado di formare legami idrofobici, nelle associazioni uniche grazie alla dinamicità conformazionale di quest'ultime.



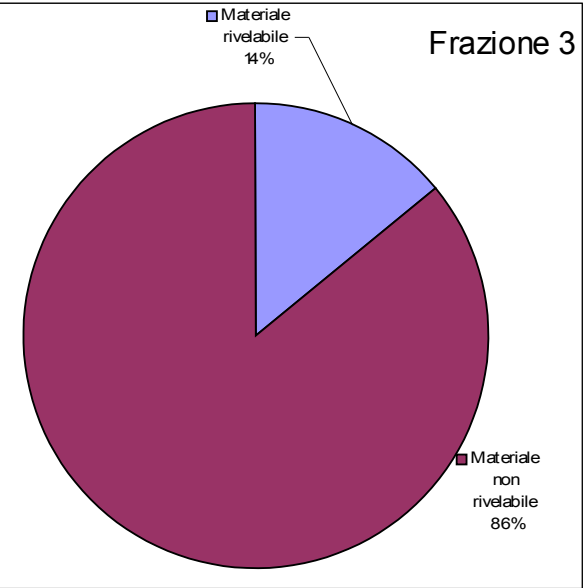
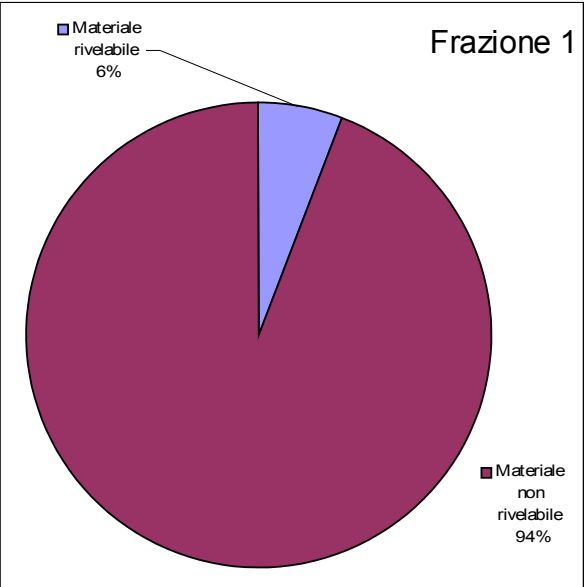
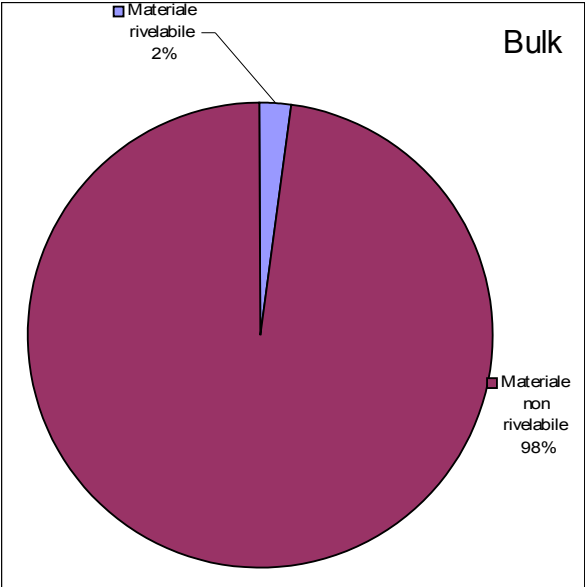
**Figura 5.31a:** Rappresentazione grafica della distribuzione gravimetrica (%) delle componenti in funzione della struttura chimica



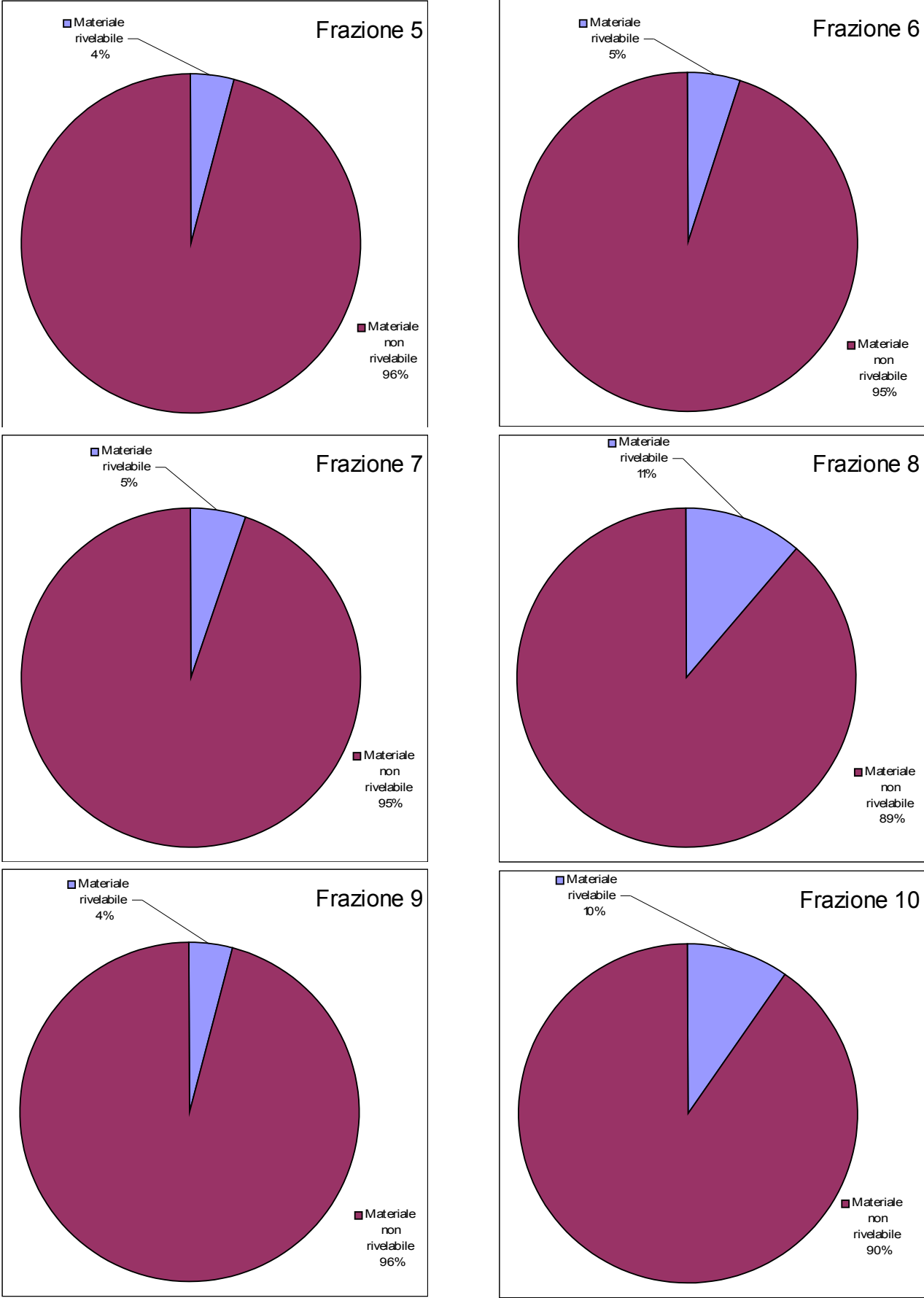
**Figura 5.31b:** Rappresentazione grafica della distribuzione gravimetrica (%) delle componenti in funzione della struttura chimica



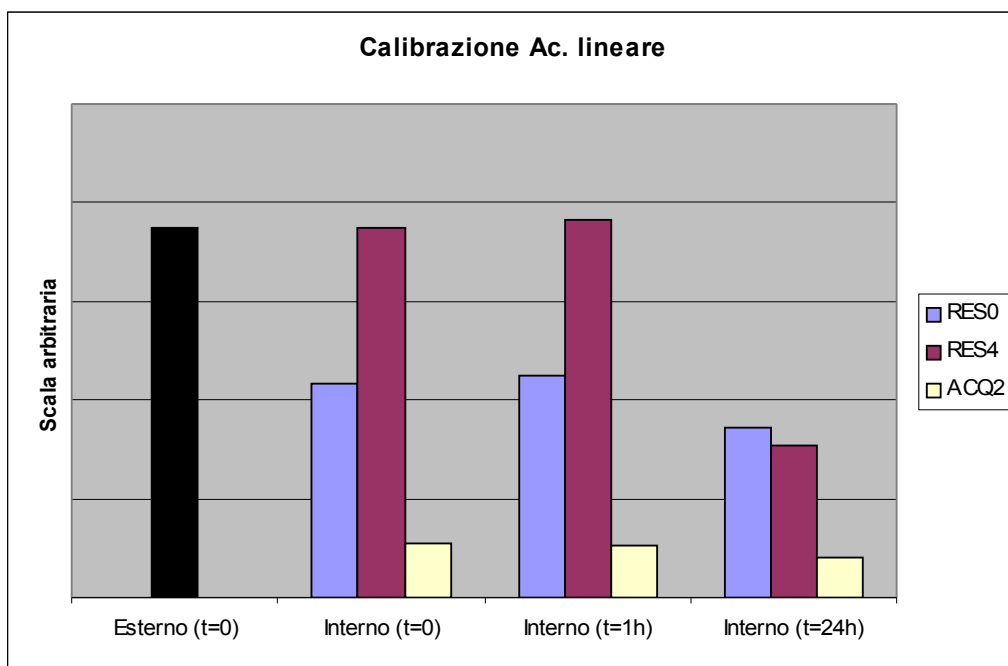
**Figura 5.31c: Rese (%) di analisi strumentale di RES4 e frazioni rispetto al materiale iniettato**



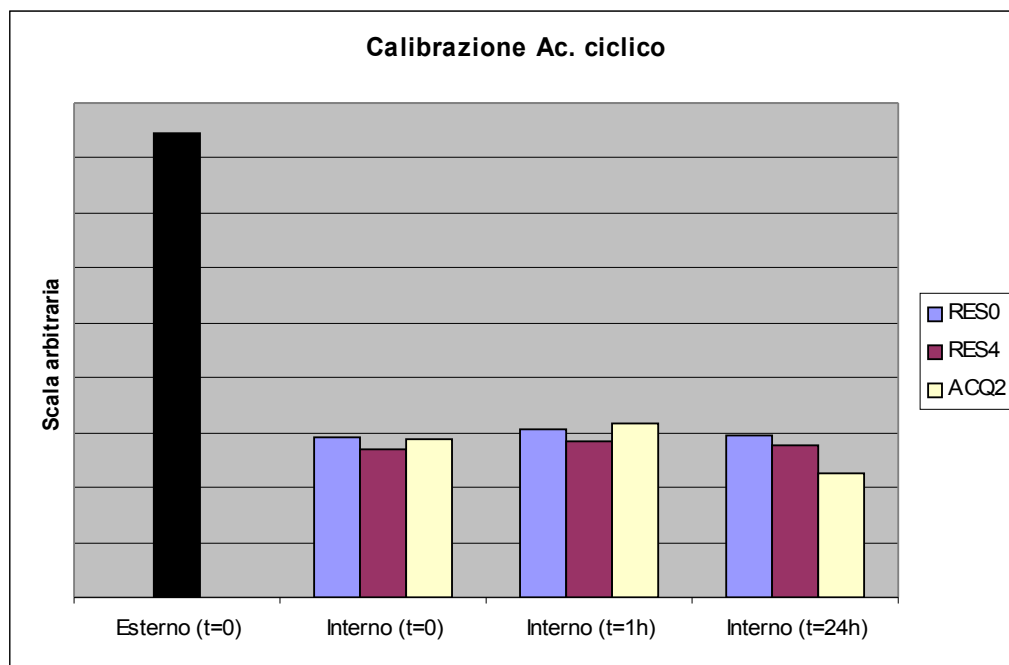
**Figura 5.31d: Rese (%) di analisi strumentale di RES4 e frazioni rispetto al materiale iniettato**



**Figura 5.32a:** Aree di integrazione per acido esadecanoico d-3 (standard per acidi lineari) a confronto (Scala arbitraria)



**Figura 5.32b:** Aree di integrazione per acido idrossibenzoico  $^{13}\text{C}$ -6 (standard per acidi ciclici) a confronto (Scala arbitraria)



**Legenda:** In nero: risposta come standard esterno, in azzurro, viola e giallo: standard interno inoculato rispettivamente in RES0, RES4 e ACQ2,

Sull'asse delle ascisse l'andamento in funzione del tempo di contatto con il campione

Tutti i dati sono da intendersi con deviazioni standard relative entro il 10%

## 5.14 Spettroscopia NMR di HA RES4 e frazioni

### 5.14.1 Aspetti generali

La spettroscopia NMR in fase solida è la tecnica di caratterizzazione analitica non distruttiva più affidabile e versatile associata alle sostanze umiche, e le informazioni che produce, sebbene meno dettagliate rispetto agli esperimenti in soluzione e di MS, sono rappresentative dell'intero campione. Il campione è inoltre analizzato senza bisogno di operazioni di trasformazione che possono introdurre artefatti, e si trova nella sua originale organizzazione molecolare. Gli esperimenti in soluzione hanno un'applicabilità diversa rispetto alla fase solida, ma operano una caratterizzazione molto più dettagliata e perciò sono ad essa complementari. Le informazioni ottenute con la spettroscopia NMR possono corroborare le ipotesi scaturite dagli esperimenti di MS riportati in precedenza.

In fase liquida, la scarsa solubilità degli HA nella maggior parte dei solventi costringe a ricorrere all'uso di acqua deuterata ( $D_2O$ ) con sodio idrossido, e anche in questo caso le concentrazioni in cui si può operare sono piuttosto modeste. La  $D_2O$  alcalina, inoltre, impedisce la rivelabilità dei protoni scambiabili, e i risultati sono associati ad HA nella loro organizzazione supramolecolare indotta dalla formazione degli umati, elemento che deve essere tenuto in considerazione nella discussione dei dati per evitare di incorrere in falsi negativi nella valutazione qualitativa dei picchi. Va infine ribadito che l'analisi NMR di miscele limita la definizione dei sistemi di *spin*, in quanto sono possibili sovrapposizioni di segnali.

### 5.13.2 RES4: Spettroscopia $^{13}C$ NMR in fase solida

Nelle **Figura 5.33a** sono illustrati i risultati degli esperimenti di Cross Polarization Magic Angle Spinning (CP-MAS)  $^{13}C$ -NMR associato a HA-Vico RES4 (intero residuo dopo trattamento con HI). Sono riscontrabili tre maggiori gruppi di segnali, il più rilevante di essi, nell'intervallo tra 110 e 145 ppm, è attribuibile a carboni con ibridazione  $sp^2$  impegnati in doppio legame con un altro

carbonio, ovvero molecole aromatiche e/o olefiniche. I segnali tra 0 e 60 ppm sono attribuiti a atomi di carbonio con ibridazione  $sp^3$ , e, a seconda della sostituzione si avranno carboni alifatici (0-30 ppm) e idrossi alchilici (30-60 ppm), mentre la regione spettrale tra 60 e 90 ppm, dove risuonano i carboni dei carboidrati, è scarsamente rappresentata. I gruppo di segnali a campi bassi compreso tra 150 e 185 raccoglie tutti i gruppi carbonilici e carbossilici, insieme ai carboni aromatici ossidrilati. Del raffronto illustrato in **Figura 5.33b** con lo spettro di Dipolar Dephasing, che esclude carboni legati a protoni, emerge chiaramente che più della metà degli atomi di carbonio con ibridazione  $sp^2$  sono privi di sostituenti protonici (carboni quaternari), e accanto a questi si registra una piccola frazione di segnali alifatici a campi molto alti (<30 ppm). Questo ultimo dato indica la presenza di strutture cicliche, probabilmente terpeniche. Le aree dei segnali normalizzati all'intervallo 150-185 ppm sono riassunte in **Tabella 5.18a**.

L'esperimento di Variable Spin Lock (VSL) permette la misura del tempo di rilassamento spin-lattice nel reticolo ( $T_{1\rho}H$ ) dei carboni in fase solida. Questo dato è riconducibile alla rigidità molecolare che caratterizza i carboni in funzione della forza di impaccamento nel cristallo o nel solido amorfo, la mobilità infatti è associata ai tempi più brevi necessari al trasferimento della magnetizzazione a un'altra molecola vicina. I valori di  $T_{1\rho}H$  alti sono invece associati a una maggiore rigidità molecolare e minore capacità di trasferimento di magnetizzazione. I valori misurati per i campioni **RES4** e **RES0** sono confrontati nella **Tabella 5.18b**. L'architettura molecolare totale di **RES4** è lievemente più rigida, e ciò è principalmente dovuto all'effetto dei segnali aromatici e olefinici, che presentano un aumento di oltre 1 ms. Questo dato è in accordo con l'ipercromismo UV descritto in precedenza (Cap. 4).

Il materiale residuo **RES4** ha quindi subito, nel corso del frazionamento, la rimozione di quasi tutto il materiale saccaridico (o alchilico idrossilato) e una forte riduzione del materiale alifatico organico rispetto all'acido umico di partenza. Le sostanze aromatiche, composte per più

della metà da carboni quaternari, hanno quindi potuto raggiungere una più forte reciproca associazione ( $\pi$ - $\pi$ ), aumentando la rigidità e l'assorbanza di **RES4**.

**Tabella 5.18a: Valori di integrazione dei segnali (Scala arbitraria) da esperimenti  $^{13}\text{C}$  Cross Polarization Magic Angle Spinning (CP-MAS) e Dipolar Dephasing (DD) di HA RES4 a confronto. Area di riferimento: integrazione 150-185 ppm**

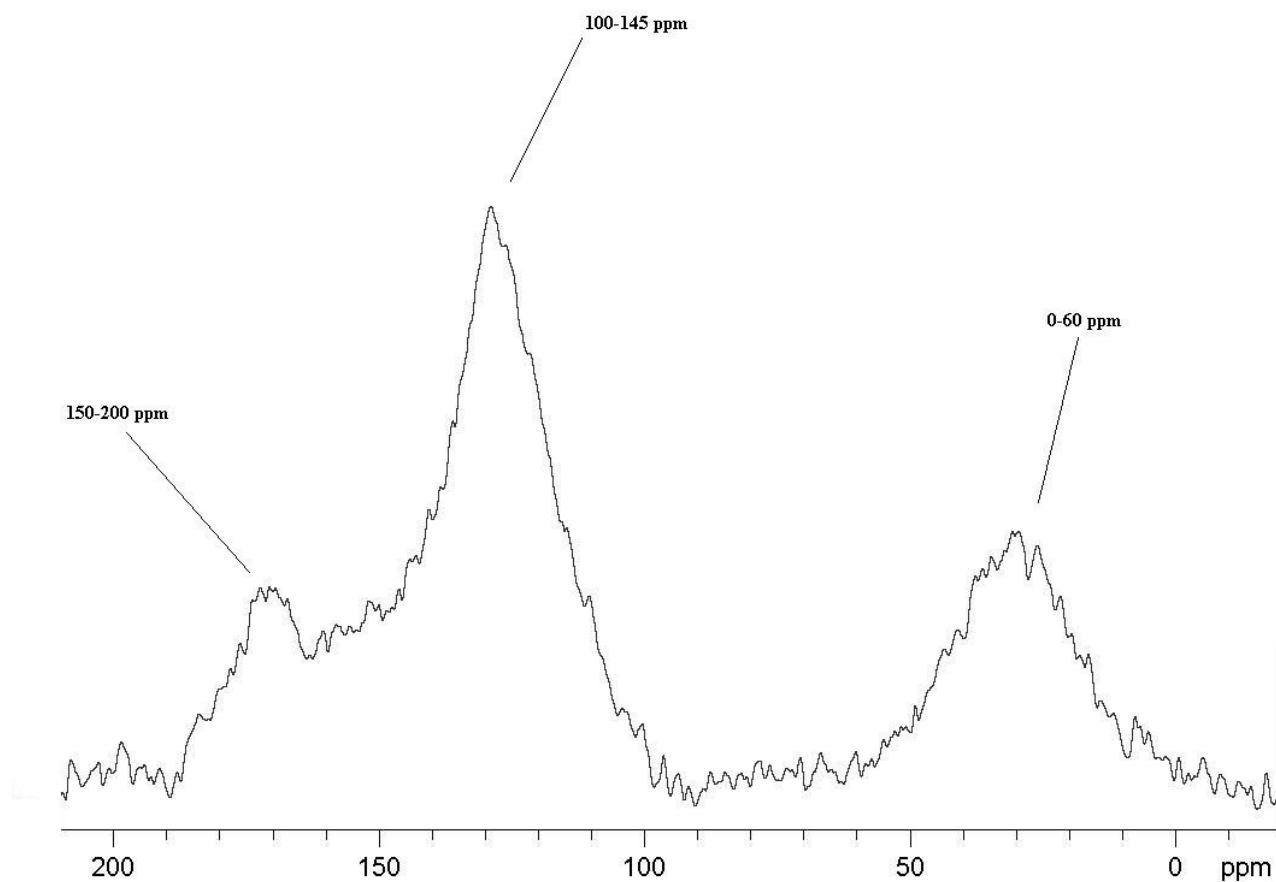
Regione spettrale	150-185 ppm	95-150 ppm	0-60 ppm
CP-MAS	1.00	3.42	1.30
DD	1.00	2.47	0.42

**Tabella 5.18b: Valori di  $T_{1\rho}\text{H}$  (ms) da esperimenti di Variable Spin Lock (VSL) di HA RES0 e RES4 a confronto**

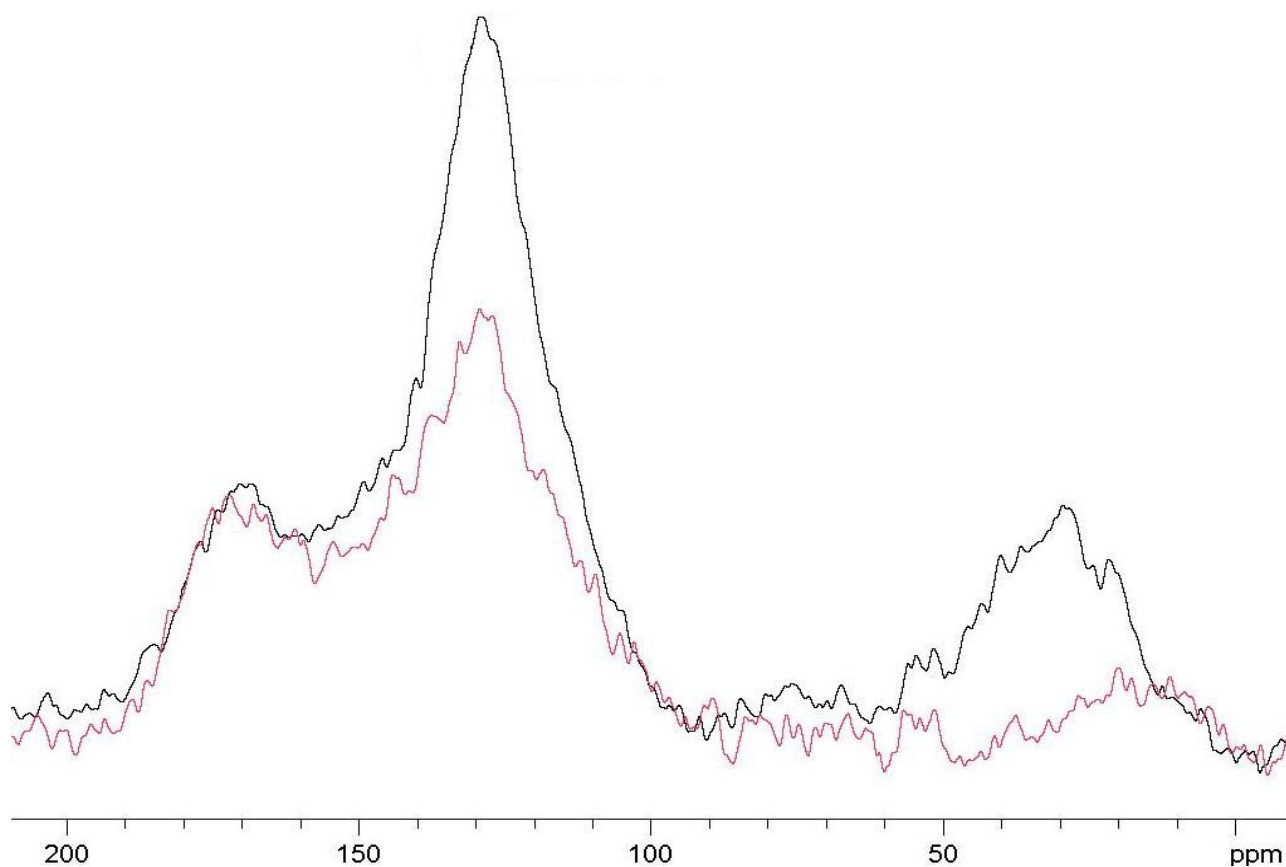
Regione spettrale	150-185 ppm	95-150 ppm	60-95 ppm	0-60 ppm
HA RES0	2.4	3.4	2.6	4.4
HA RES4	2.7	5.0	Assente	5.3



**Figura 5.33a:** Spettro CP-MAS NMR di HA RES4 solido con i principali segnali in evidenza



**Figura 5.33b:** Spettro NMR Dipolar Dephasing (DD) (in rosso) vs CP-MAS (in nero)



#### 5.14.3 RES4: Spettroscopia NMR monodimensionale in soluzione

Gli esperimenti  $^1\text{H}$ -NMR monodimensionale e gli esperimenti 2D di omo- ed etero-correlazione completano la descrizione spettroscopica del materiale unico residuo **RES4**. La evidenziata natura quaternaria di gran parte del carbonio aromatico e la forte associazione degli orbitali  $\pi$  degli anelli riduce sensibilmente il profilo degli spettri a campi bassi per via di rapidissimi tempi di rilassamento T1 e T2. Tuttavia, le altre regioni spettrali risentono meno di questo effetto. Nelle **Figure 5.34, 5.36, 5.38, 5.40, 5.42, 5.44 e 5.46** sono riportati gli spettri NMR per il materiale **RES4 bulk** a confronto con le **Frazioni 1-7** da esso separate per HPSEC. Lo spettro del primo risulta molto meno definito, con meno picchi e di forma piuttosto slargata, mentre le **Frazioni** risultano meglio definite. Questo dato conferma l'effetto disaggregante (e perciò semplificativo della miscela molecolare) dovuto alla separazione HPSEC nei confronti del materiale **bulk**. Mentre in tutti gli spettri la regione aromatica è caratterizzata da un segnale molto largo e poco definito, nelle **Frazioni 1 e 5** si riscontrano alcuni picchi che emergono dal rumore di fondo. E' possibile che questi segnali siano presenti anche negli altri campioni, ma la loro minore intensità ne impedisce la distinzione.

La regione olefinica intorno ai 5.0 ppm presenta un segnale molto evidente nelle **Frazioni 1-7 (Figure 5.36, 5.38, 5.40, 5.42, 5.44 e 5.46)**, ma molto meno nel materiale **bulk (Fig. 5.34)**. La parte centrale dello spettro (**3.0-6.0 ppm**) propone molti segnali di protoni in posizione adiacente a una funzione ossigenata (**3.0-4.0 ppm**), e la cui larghezza presuppone una molteplicità notevole di risonanze. Ciò escludere la posizione terminale del gruppo responsabile dei segnali, che altrimenti produrrebbe semplici tripletti.

La regione tra 1.5 e 2.5 ppm (**Fig 5.34, 5.36, 5.38, 5.40, 5.42, 5.44 e 5.46**) racchiude protoni alifatici in prossimità di una funzione carbonilica o olefinica. Questi segnali sono piuttosto ubiquiti negli spettri ottenuti per le frazioni separate, ma sono scarsamente definiti nel materiale **bulk**.

La regione a campi alti degli spettri è caratterizzata dallo sviluppo tipico delle sostanze alifatiche lineari: un segnale metilico intorno a ppm 0.80, un sistema non del primo ordine intorno a ppm 1.25, e, una spalla a ppm 1.48, dovuta a metileni in  $\beta$  rispetto al carbossile terminale e protoni metinici in corrispondenza di ramificazioni. In alcuni casi, come nella **Frazione 3 (Figura 5.40)**, si intravede un segnale a 1.0 ppm, attribuibile ad un metile in posizione  $\beta$  rispetto a un ossidrile. Il materiale bulk è scarsamente definito, tuttavia presenta alcuni intensi segnali con molteplicità e chemical shift piuttosto peculiare e che è possibilmente assegnabile a un gruppo  $\text{CH}_3\text{CHOH-R}$ , dove R non ha protoni sostituenti. Questi risultati sono riassunti nelle **Tabelle 5.19-25**.

#### 5.14.4 RES4: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione: HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy)

I risultati di esperimenti HSQC per i campioni **RES4** e relative **Frazioni 1-7** sono illustrati nelle **Figure 5.35a, 5.37a, 5.39a, 5.41a, 5.43a, 5.45a e 5.47a**.

L'analisi degli spettri di correlazione H-C permette di confermare le assegnazioni dei segnali protonici associando loro il valore di *chemical shift* del carbonio a cui sono legati. Nella maggior parte dei casi, gli spettri di HA **RES4** e delle frazioni analizzate hanno quindi un valore di controllo. I protoni nell'intervallo 6.0-9.0 ppm nella **Figura 5.45a** sono correlati con carboni a valori associati in letteratura solitamente ad anelli aromatici. Il segnale protonico intorno a ppm 5, ove presente, è correlato con un carbonio nella regione spettrale tipica dei gruppi olefinici. Per quei *cross peaks* che coinvolgono protoni tra 3.0 e 4.0 ppm ci si aspetta correlazioni con carboni tra 60 e 65 ppm, e tale relazione è confermata dagli spettri. I segnali metilenici in prossimità di gruppi elettron-attrattori, come carbonili o doppi legami C-C, risentono dell'orbitale  $\pi$  tanto nei valori di shift del protone che del carbonio, gli effetti di spostamento comunque sono in genere più blandi sul carbonio che sul protone. Tutti i *cross peaks* attribuiti a questi segnali in prossimità di un gruppo elettrofilo variano tra  $F2=2.2-2.4$ ;  $F1=30-40$  ppm. La correlazione più intensa in tutti gli spettri riguarda l'intervallo

2.25-2.29 ed è attribuibile a lunghe catene di metileni. I segnali metilici risuonanti a 0.8 ppm sono correlati con carboni a 14 ppm, il valore più consueto per i segnali metilici.

Segnali che si discostano dalle attribuzioni più ovvie sono presenti in tutti gli spettri riportati. Sebbene risulti impossibile assegnarli in modo univoco per la mancanza di altri riscontri, in molti casi è possibile formulare delle ipotesi in base alle informazioni ottenute sia via MS, sia via NMR in fase solida. Protoni metilici e metilenici che si discostano in negativo dal valore classico di *shift* carbonioso (rispettivamente intorno 19 e 29 ppm) sono riconducibili a fenomeni di rigidità molecolare di atomi che compongono un anello. Questi anelli che sono stati già menzionati in relazione ai dati di Dipolar Dephasing (DD) come spiegazione della presenza di carboni quaternari alifatici, con l'esperimento HSQC si caratterizzano ulteriormente con l'individuazione di una correlazione carbonio protone molto caratteristica. I *cross peaks* a valori di chemical shift H-C compresi tra 1.8; 23 e 1.9; 25 ppm sono di difficile attribuzione, essendo il valore di shift protonico molto schermato, ma il carbonio a cui si lega risulta molto schermato. Infatti, il valore di spostamento del carbonio intorno a 23-25 è attribuito a catene alifatiche non funzionalizzate, tuttavia i protoni che legano questi atomi di carbonio risuonano a valori (1.8-1.9 ppm) che sono influenzati necessariamente da atomi elettronegativi.

I risultati sono riassunti nelle **Tabelle 5.19-25**.

#### 5.14.5 RES4: Spettroscopia NMR bidimensionale in soluzione: Correlation Spectroscopy (COSY) e Total Correlation Spectroscopy (TOCSY)

Gli spettri di omocorrelazione a breve raggio misurano la correlazione tra protoni su uno stesso carbonio o tra carboni adiacenti (COSY). Un sistema di spin è una catena di segnali in cui tutti i picchi sono correlati ad almeno uno degli altri. Un esperimento di correlazione *long range* è in grado di correlare tra loro tutti i protoni di un sistema di spin (TOCSY). Questi esperimenti condotti sul campione di HA **RES4** e sulle sue **Frazioni 1-7** consente di porre i segnali che finora

abbiamo studiato singolarmente in una certa contiguità strutturale. Lo studio dei sistemi di spin è purtroppo limitato dall'eterogeneità della sostanza in esame. Le **Figure 5.35b-c, 5.37b-c, 5.39b-c, 5.41b-c, 5.43b-c, 5.45b-c e 5.47b-c** illustrano gli spettri COSY e TOCSY acquisiti.

La regione spettrale aromatica, che risultava poco leggibile nelle applicazioni monodimensionali per un alto rumore di fondo, è invece meglio definita nella doppia dimensione.

Il materiale **bulk** (**Figura 5.35b**) presenta due correlazioni nella regione aromatica, 7.25 (F1)- 6.23 (F2) e 6.90(F1)-6.49(F2). Non essendo presenti interazioni a lungo raggio, le correlazioni devono rappresentare sistemi di spin binari del primo ordine. Il valore di *chemical shift* inferiore a 7 ppm indica un anello sostituito con un ossidrilico, che esercita un effetto elettron-donatore. Tuttavia, l'alcalinità della soluzione in esame potrebbe ionizzare parzialmente i fenoli. La forma ionizzata del fenolo ha una distribuzione elettronica dell'anello diversa rispetto alla forma protonata, questo fa risuonare i protoni legati a un fenato a una frequenza diversa, rendendo difficile l'assegnazione.

La **Frazione 1** mostra nello spettro COSY la stessa coppia di *cross peaks* F2=7.25; F1=6.23 e F2=6.90; F1=6.49 ppm, e accanto ad esse F2=7.70; F1=7.19 e F2=7.54; F1=7.33 ppm (**Figura 5.37 b**). I valori 7.70 e 7.54 sono tipici dei protoni aromatici in posizione orto rispetto a un sostituentecarbossilico, i valori 7.19 e 7.33, invece, si trovano in posizione meta rispetto alla funzione acida, perchè più distanti dal campo elettrico indotto dagli elettroni degli orbitali del legame carbonilico. La sostituzione pertanto deve trovarsi in posizione para, ma non è possibile identificarne la natura. La correlazione *long range* a 8.44; 7.36 (**Figura 5.37 c**) è piuttosto insolita in quanto correla tra loro protoni di uno stesso anello non adiacenti, questo segnale è molto probabilmente un'interazione a lungo raggio di tipo  $J^5$ . Questi accoppiamenti, detti “meta” o “para” sono piuttosto frequenti negli spettri TOCSY, meno negli spettri COSY. Valori alti di shift a 8.44 ppm suggeriscono la presenza di due gruppi elettron-attrattori, come i carbossili, in posizione adiacente a uno dei due protoni nell'anello aromatico.

La **Frazione 2** non presenta nuove interazioni a breve raggio. Tuttavia nello spettro TOCSY (**Figura 5.39c**) appare un pattern di segnali aromatico simile a quello osservato nella Frazione 1 nello spettro COSY. Questa interazione però non è visibile nello spettro COSY della frazione 2. Pertanto non è possibile caratterizzare questo sistema oltre, in assenza di altre informazioni. Nello spettro di questa frazione, il segnale a 7.70 ppm indica un protone adiacente a un carbossile, mentre il valore di 7.22 ppm è attribuibile a un protone in posizione para rispetto al carbossile stesso. In base a queste considerazioni, potremmo avere a che fare con interazione  $J^4$  tra protoni in posizione meta.

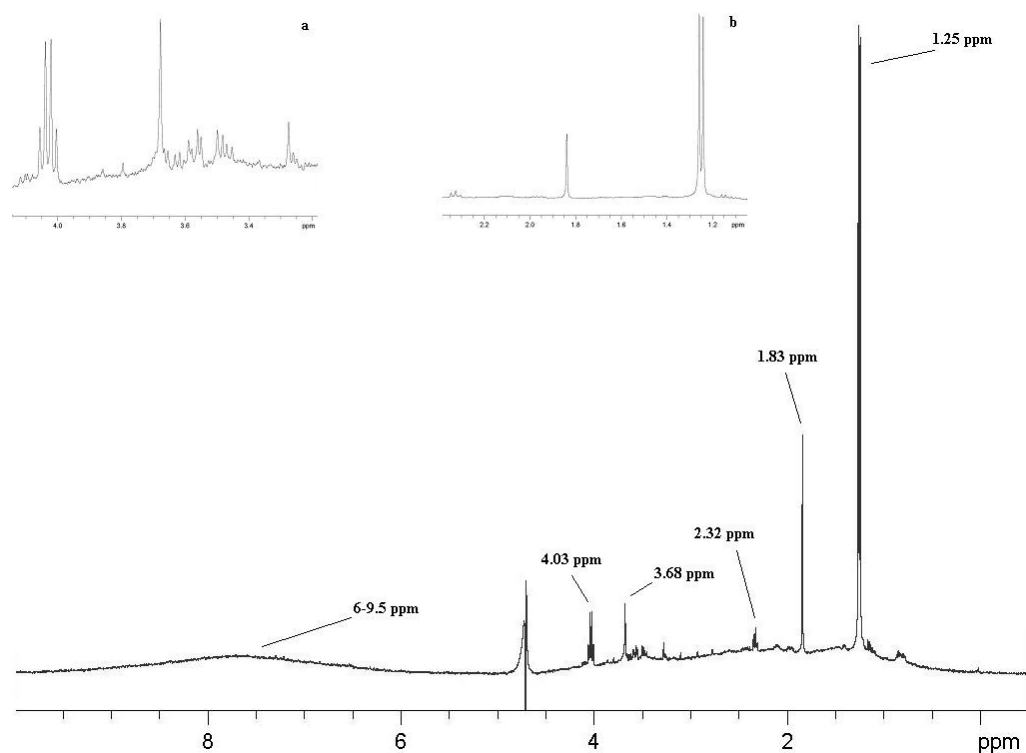
Le **Frazioni 3 e 4** non mostrano interazioni diverse rispetto a quanto precedentemente descritto. La **Frazione 5** è particolarmente dettagliata e suggerisce un sistema di spin del primo ordine AMX con tre segnali a 8.44, 7.77 e 7.36 ppm, visibili anche nel monodimensionale, in correlazione con carboni a 148, 137, 124 ppm, rispettivamente. Tra i primi due picchi è presente la correlazione *long range*, mentre il terzo è correlato a breve raggio con entrambi. Il sistema è di difficile interpretazione per valori alti di *shift*, che può anche suggerire la presenza di un sostituito solfonico sull'anello o un sistema naftalenico. Tuttavia la correlazione mostra chiaramente che il sostituito ha un effetto marcato sul protone in orto (8.44 ppm), medio sul protone in para (7.77 ppm) e solo blando sul protone in meta (7.36 ppm). Accanto a questo sistema di spin troviamo un'interazione *long range* intorno a 7.60; 5.70 ppm attribuibile a un composto insaturo non aromatico, probabilmente coinvolto in un ciclo. Infatti, valori di shift così bassi non sono generalmente associati a strutture con corrente di anello come nei gruppi aromatici, mentre viceversa la coniugazione di un carbonile può indurre uno *shift* a campi bassi di protoni olefinici che possono quindi essere scambiati per protoni aromatici. Questi dati sembrano in accordo con quanto suggerito dalla spettrometria di massa, anche se non è stata raggiunta una caratterizzazione molecolare inequivocabile per questo tipo di molecole.

Le correlazioni a campi alti sono simili per molti campioni analizzati, e sono particolarmente numerose nelle **Frazioni 1 e 2**. I sistemi di spin più comuni riguardano i terminali carbossilici degli acidi grassi, di sistemi olefinici e idrossialchilici, e di terminali alchilici.

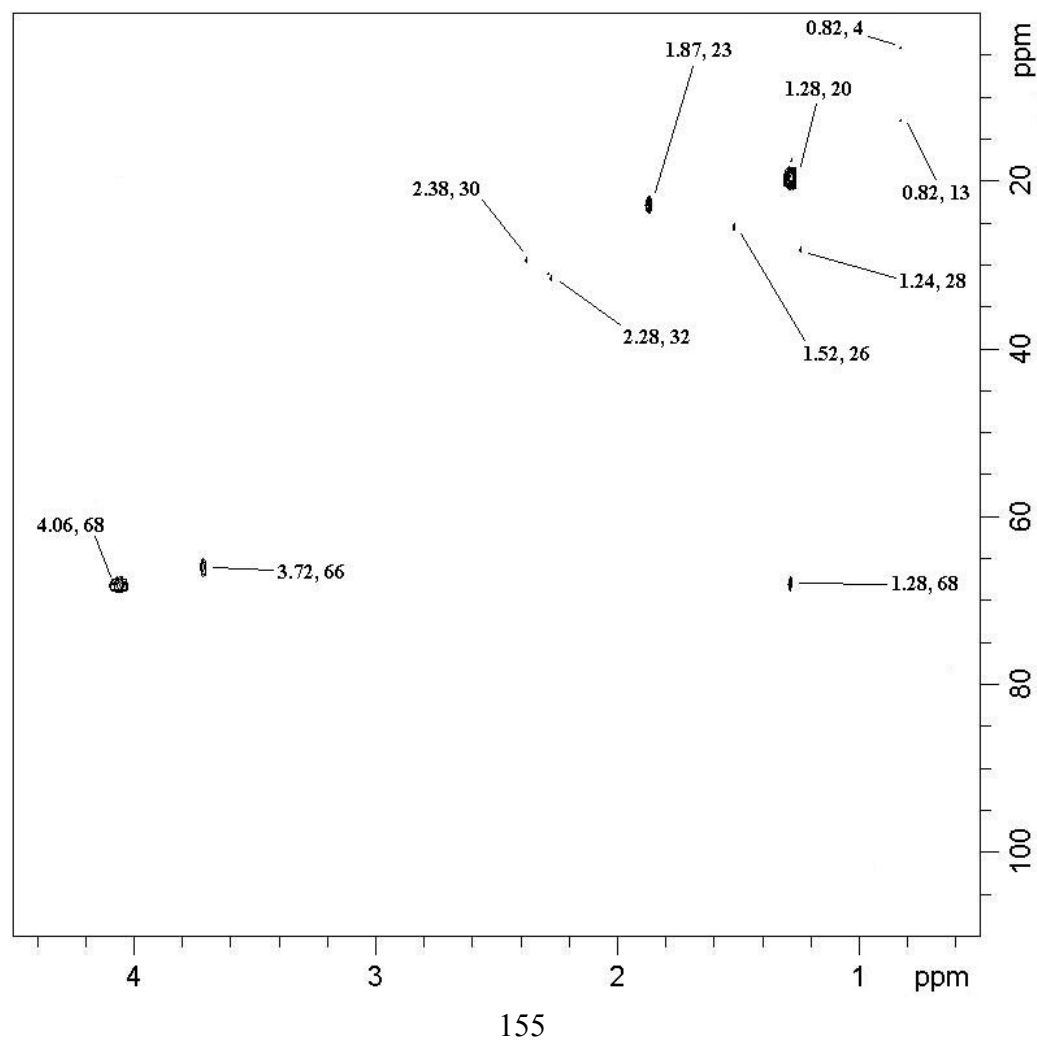
Il materiale analizzato appare quindi composto da numerosi acidi lineari a struttura variabile che presentano ossidrili e insaturazioni in posizione non terminale. In molti casi queste funzioni ossidrilate ed insature risultano adiacenti, mentre in altri casi esse appaiano separate da almeno due atomi di carbonio. Questa regione spettrale è la più caratterizzabile in NMR, mentre i segnali aromatici, a causa della scarsa risposta e alla presenza di un segnale indefinito tra 6.0 e 9.0 ppm, sono di più difficile approccio per la caratterizzazione. Le molecole aromatiche potrebbero essere aggregate in modo più compatto, e questo determina una mobilità solo parziale delle sostanze in esame, generando fenomeni di spin diffusion

Questi risultati sono schematizzati in **Figura 5.48** e riassunti nelle **Tabelle 5.19-25** e sono compatibili con i dati di NMR.

**Figura 5.34:** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR in NaOD di HA RES4 con ingrandimenti (a e b)

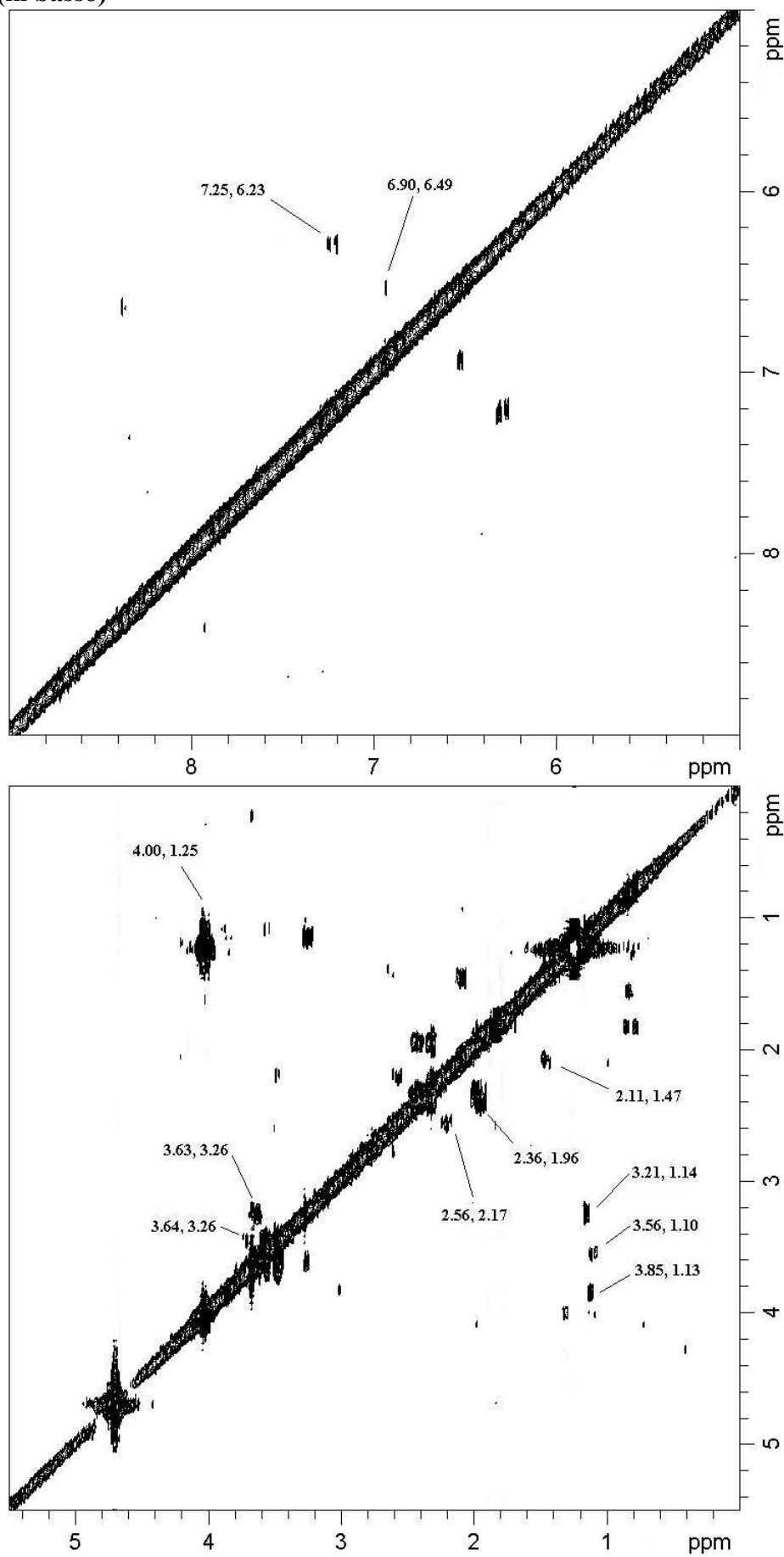


**Figura 5.35a:** Spettro HSQC di HA RES4 in NaOD

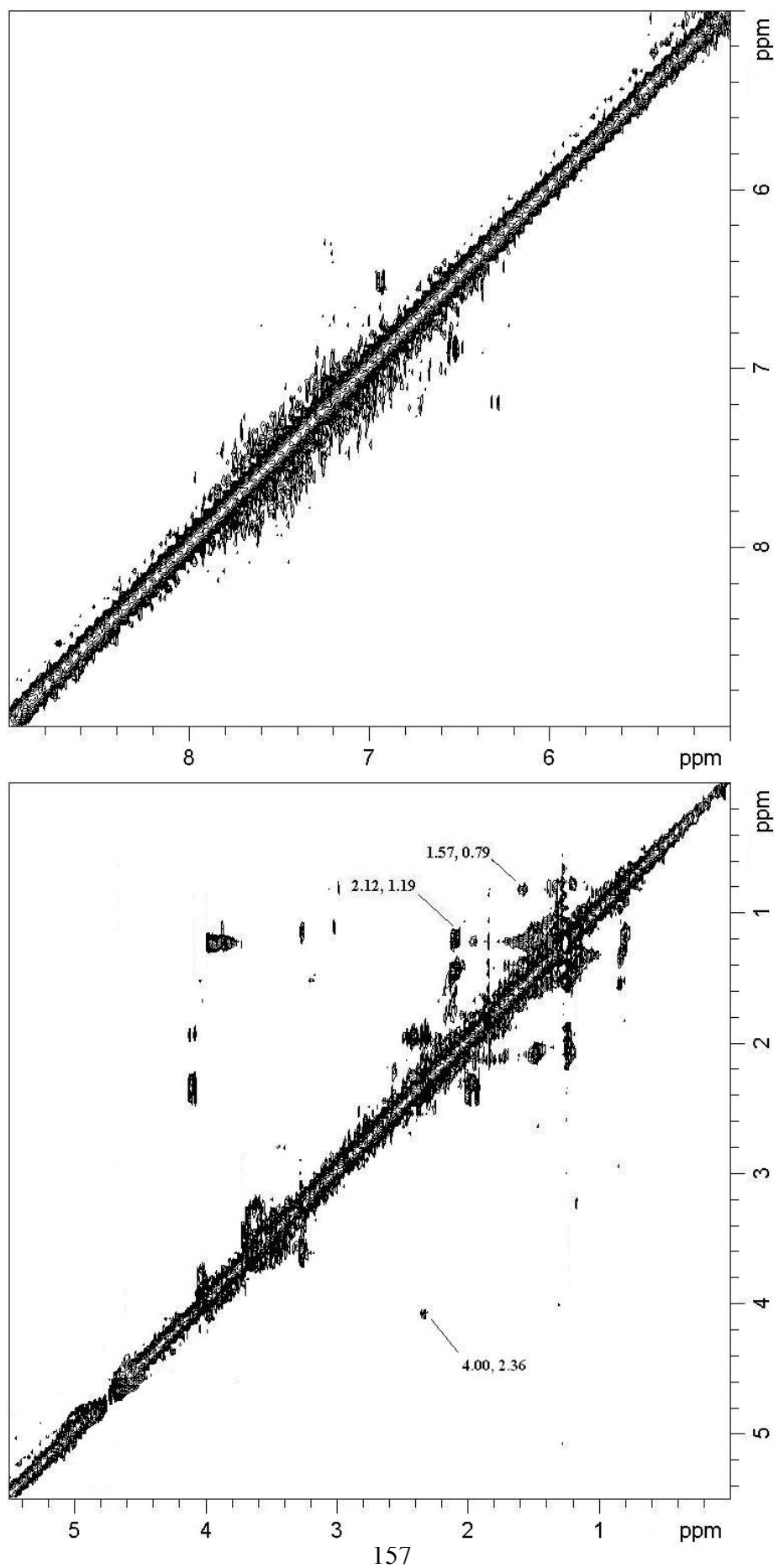




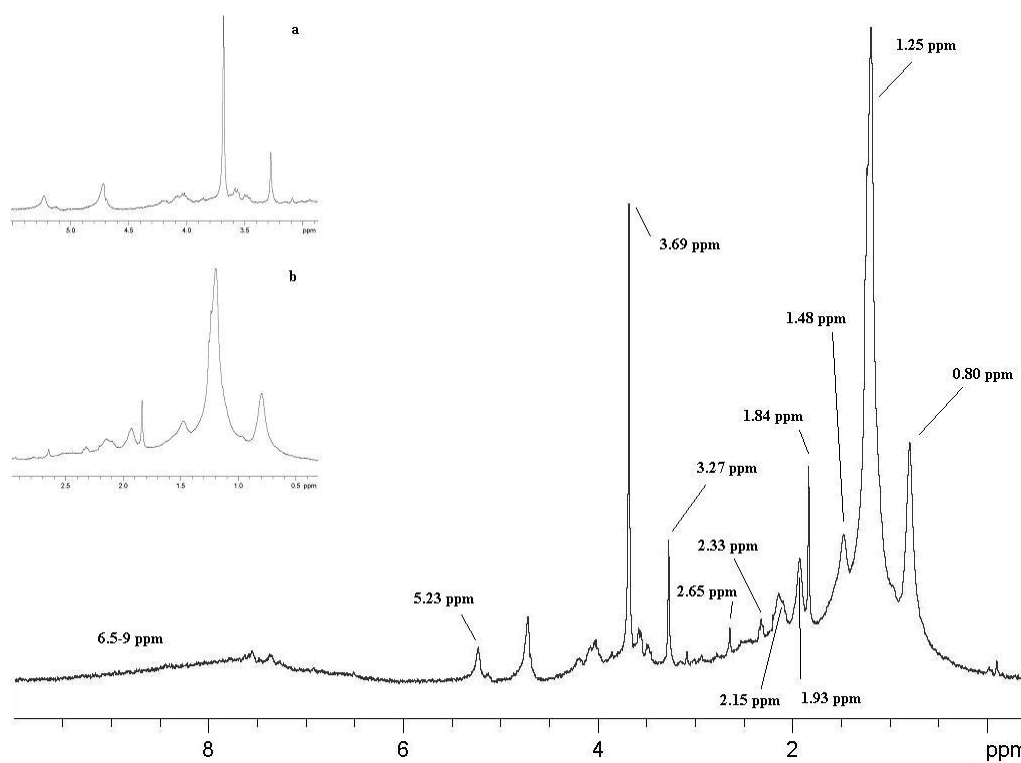
**Figura 5.35b:** Spettro COSY di HA RES4 in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso)



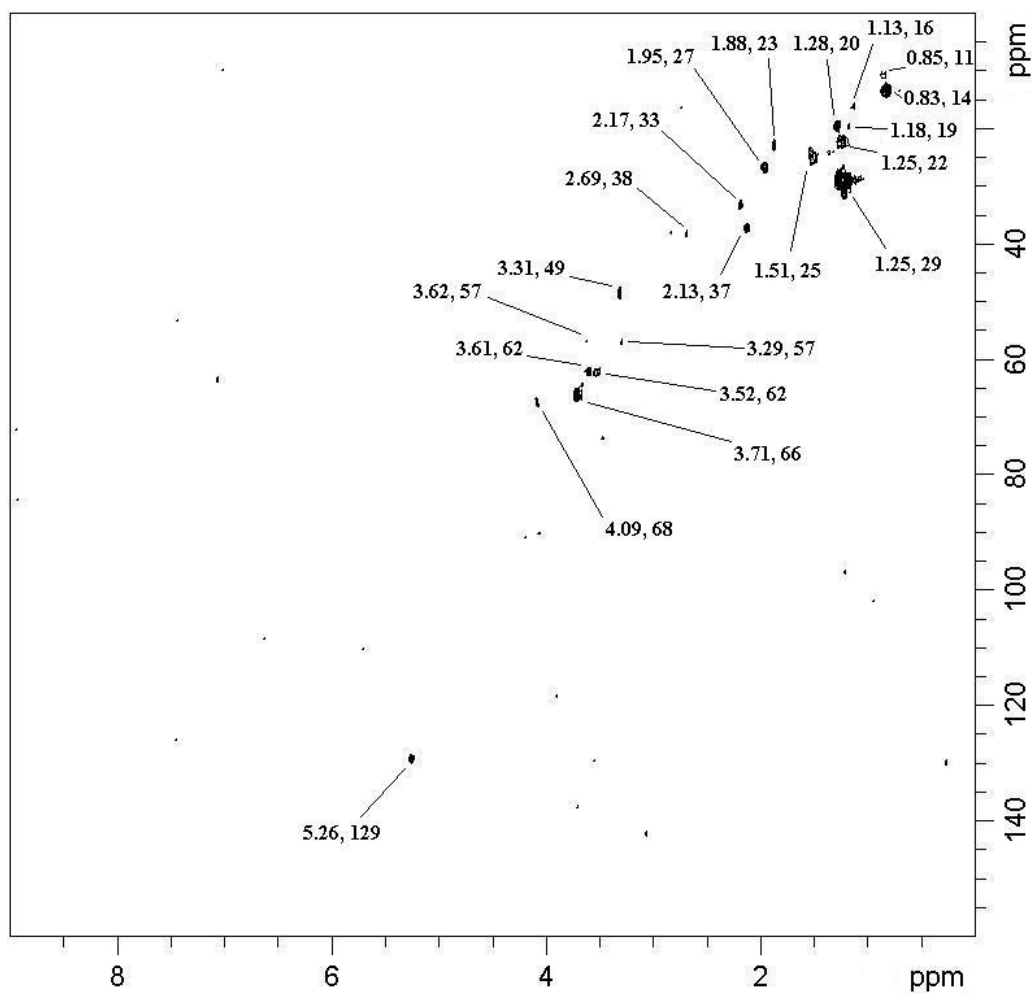
**Figura 5.35c:** Spettro TOCSY di HA RES4 in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso), in evidenza le correlazioni *long range*



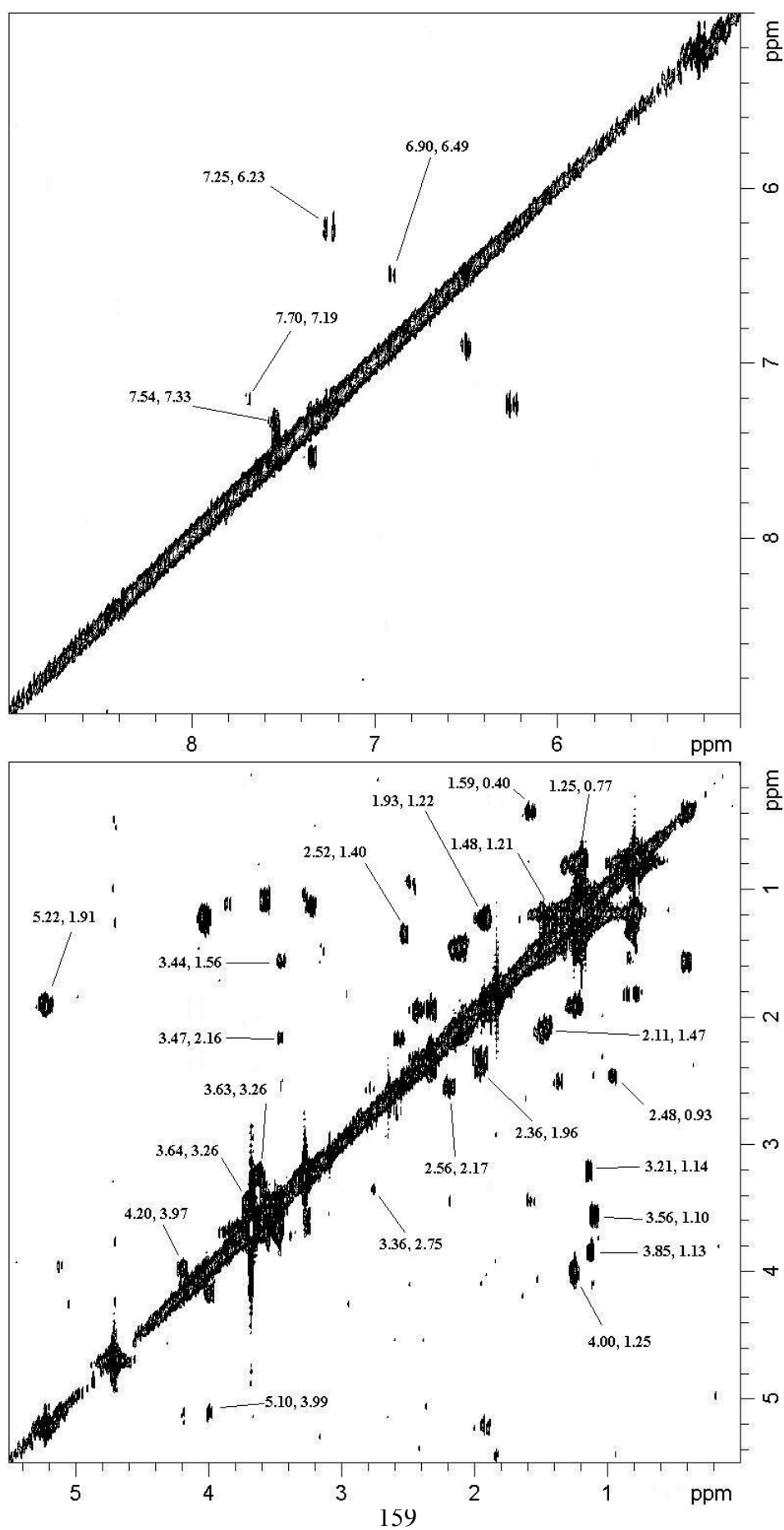
**Figura 5.36:** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR in NaOD di HA RES4 (Frazione 1) con ingrandimenti (a e b)



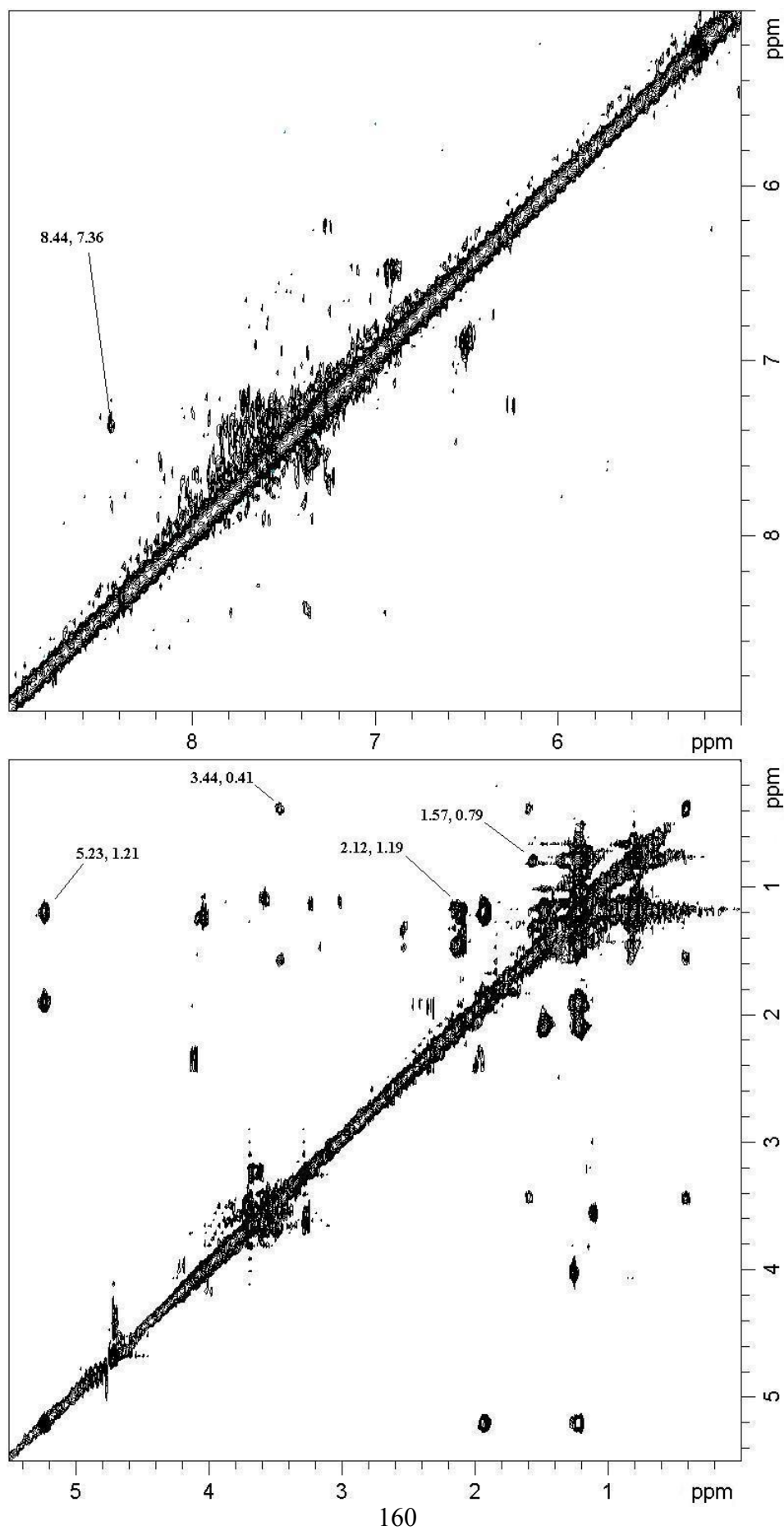
**Figura 5.37a:** Spettro HSQC di HA RES4 (Frazione 1) in NaOD



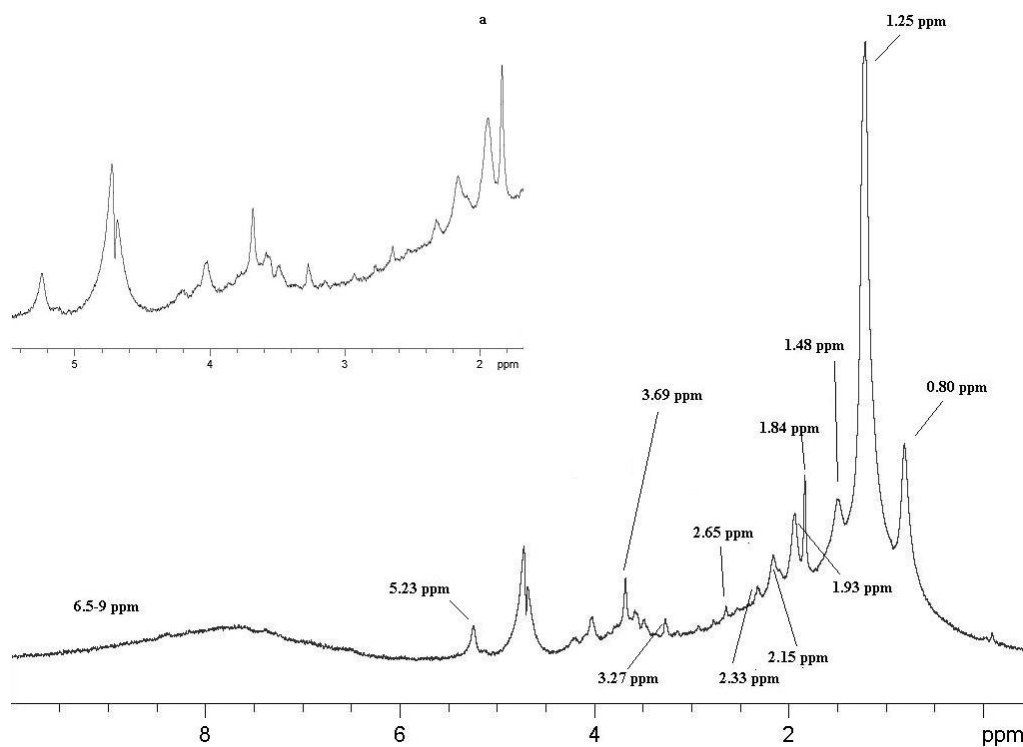
**Figura 5.37b:** Spettro COSY di HA RES4 (Frazione 1) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso)



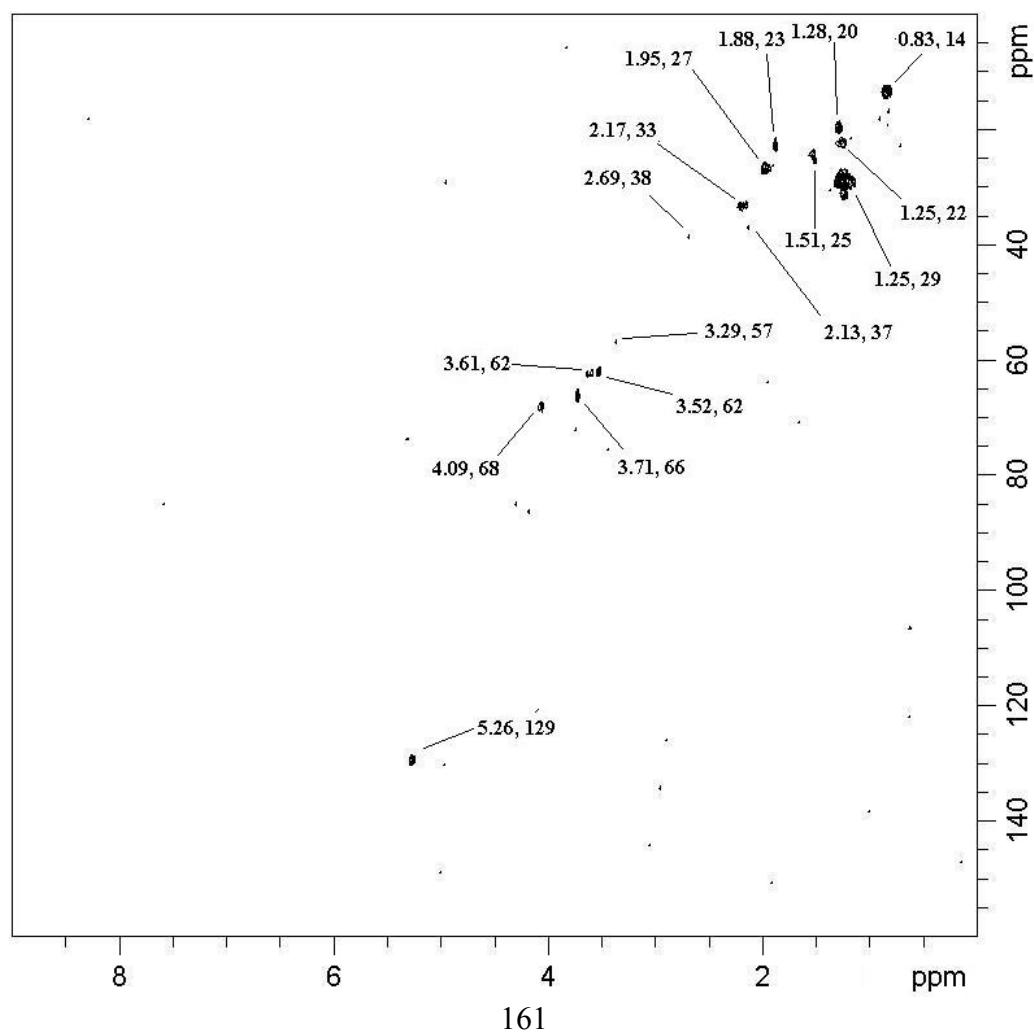
**Figura 5.37c:** Spettro TOCSY di HA RES4 (Frazione 1) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso), in evidenza le correlazioni *long range*



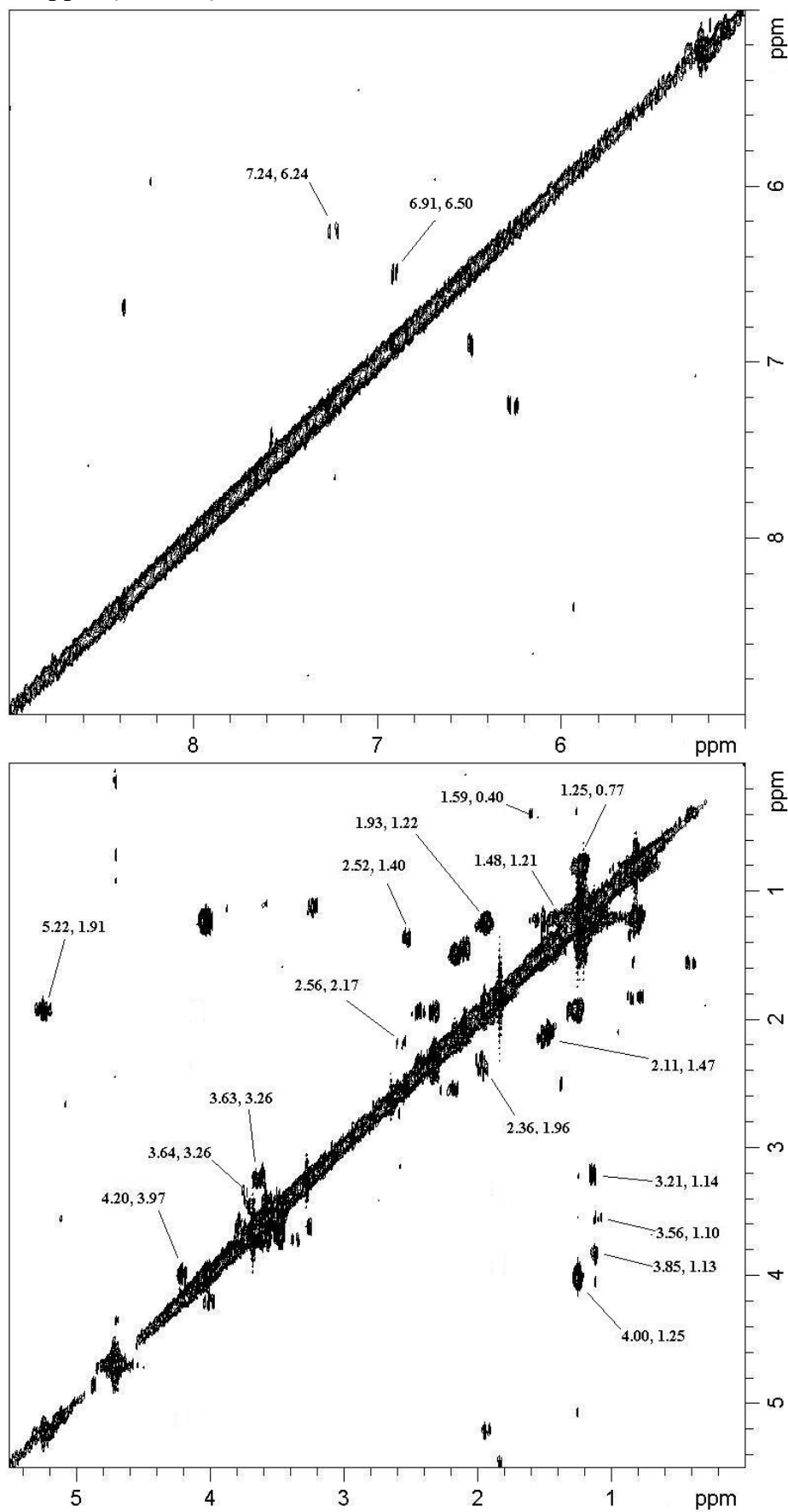
**Figura 5.38:** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR in NaOD di HA RES4 (Frazione 2) con ingrandimento (a)



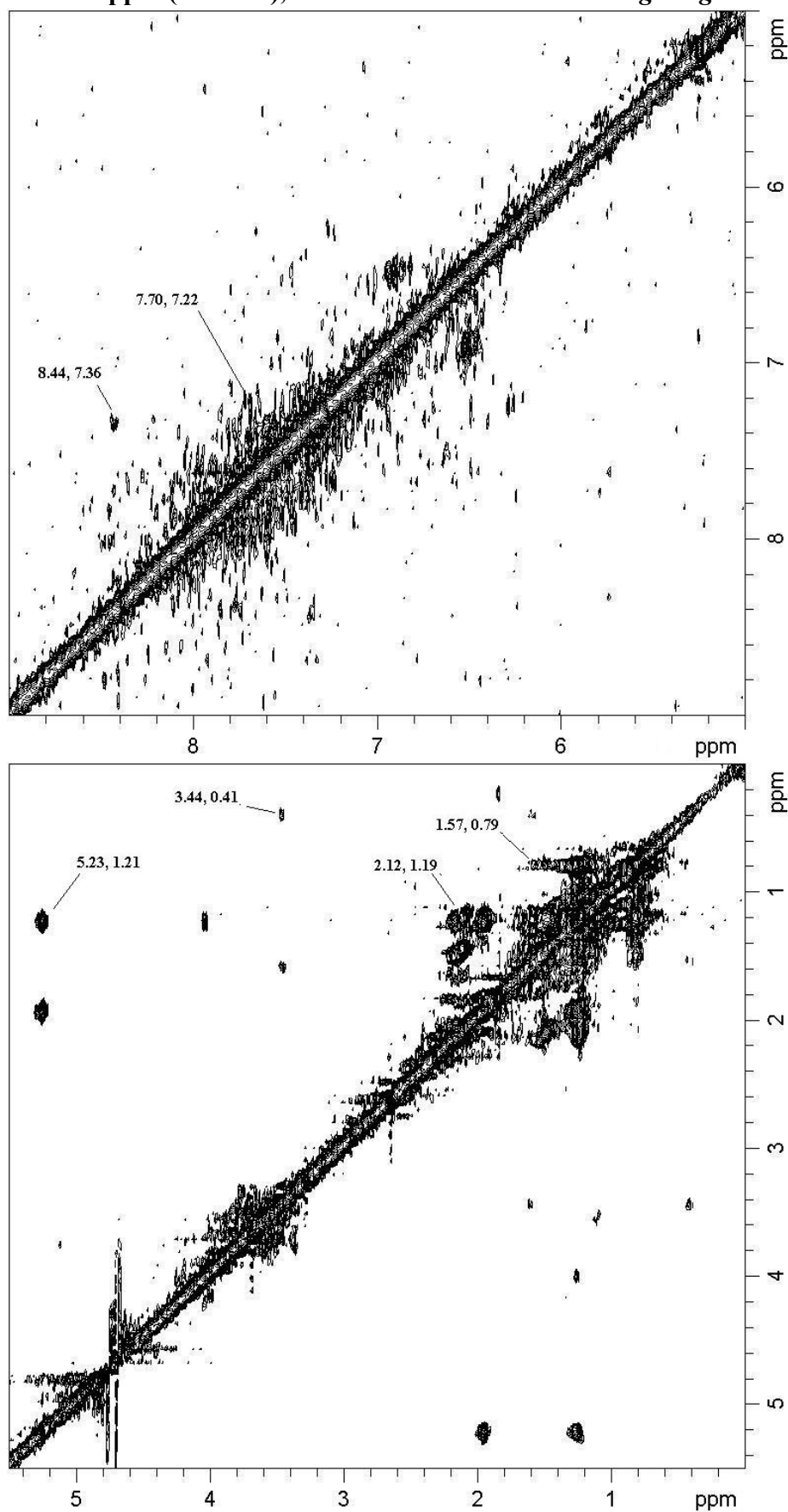
**Figura 5.39a:** Spettro HSQC di HA RES4 (Frazione 2) in NaOD



**Figura 5.39b:** Spettro COSY di HA RES4 (Frazione 2) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso)

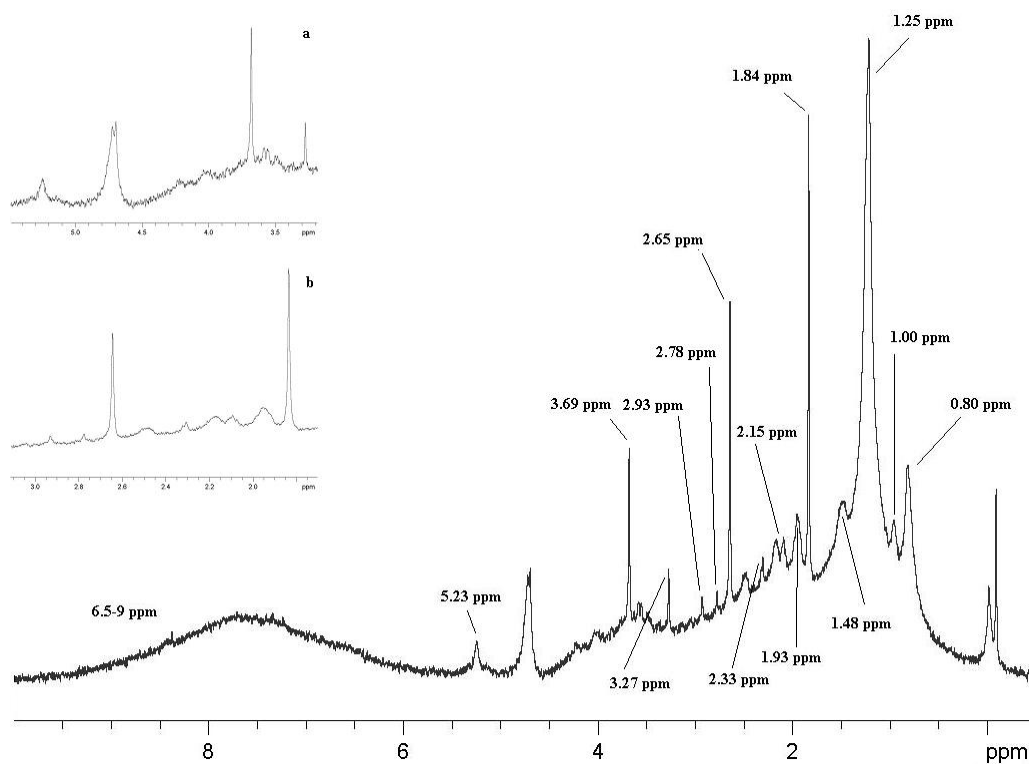


**Figura 5.39c:** Spettro TOCSY di HA RES4 (Frazione 2) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso), in evidenza le correlazioni *long range*

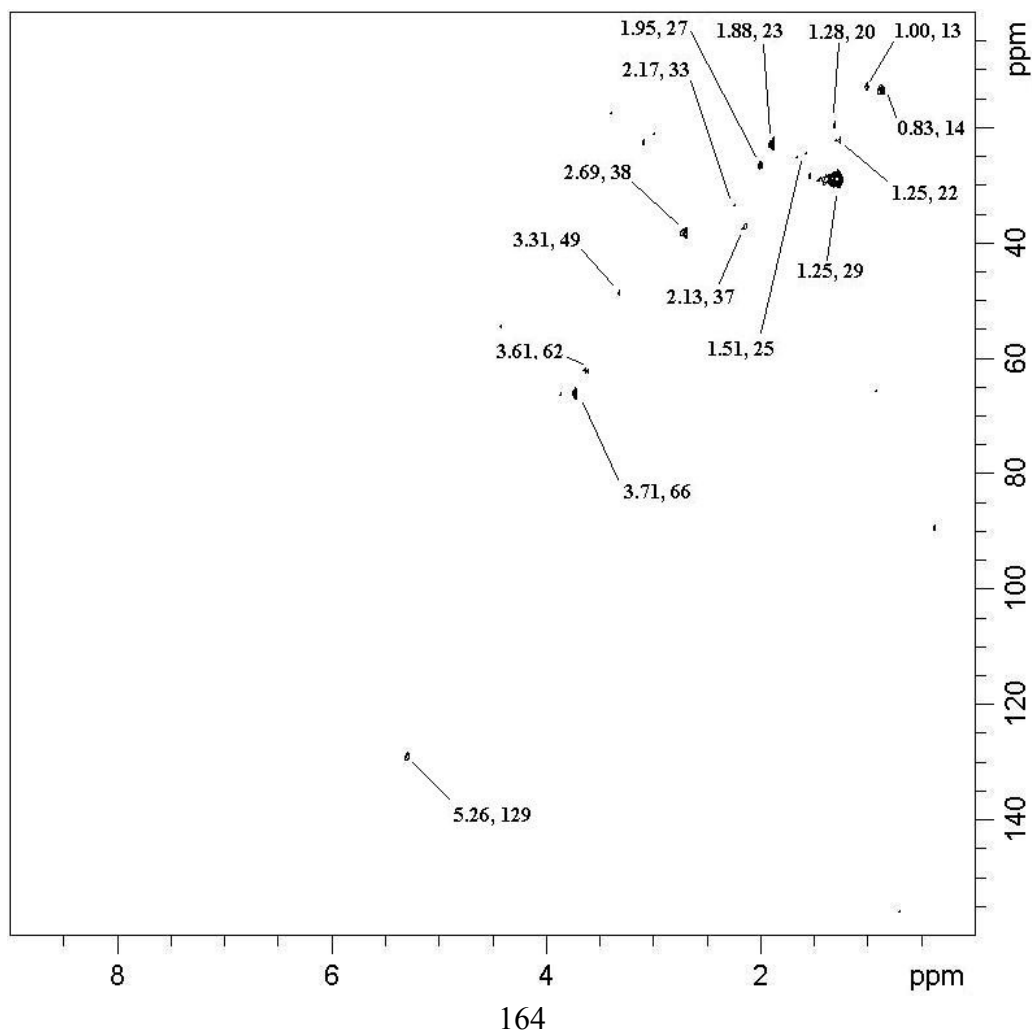




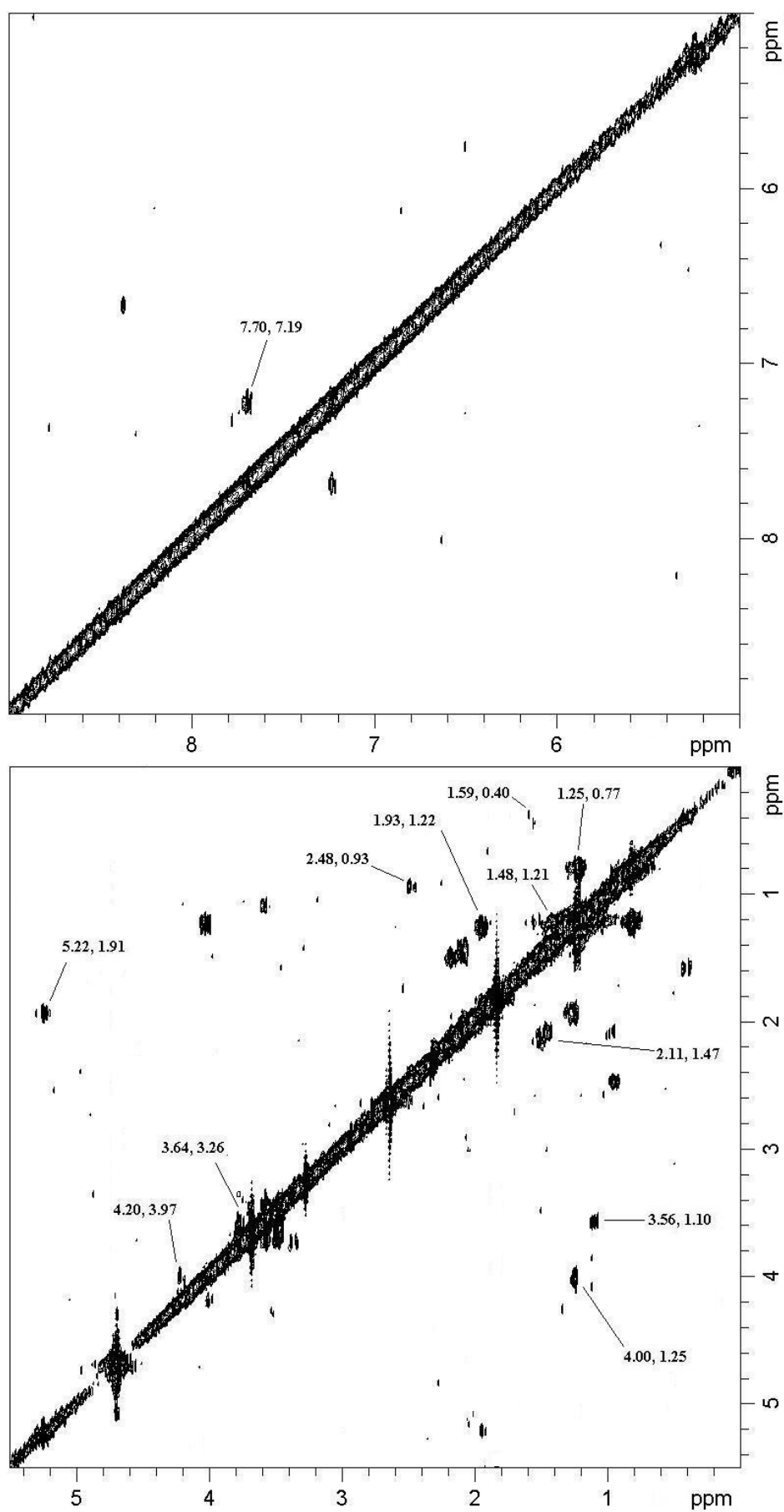
**Figura 5.40:** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR in NaOD di HA RES4 (Frazione 3) con ingrandimenti (a e b)



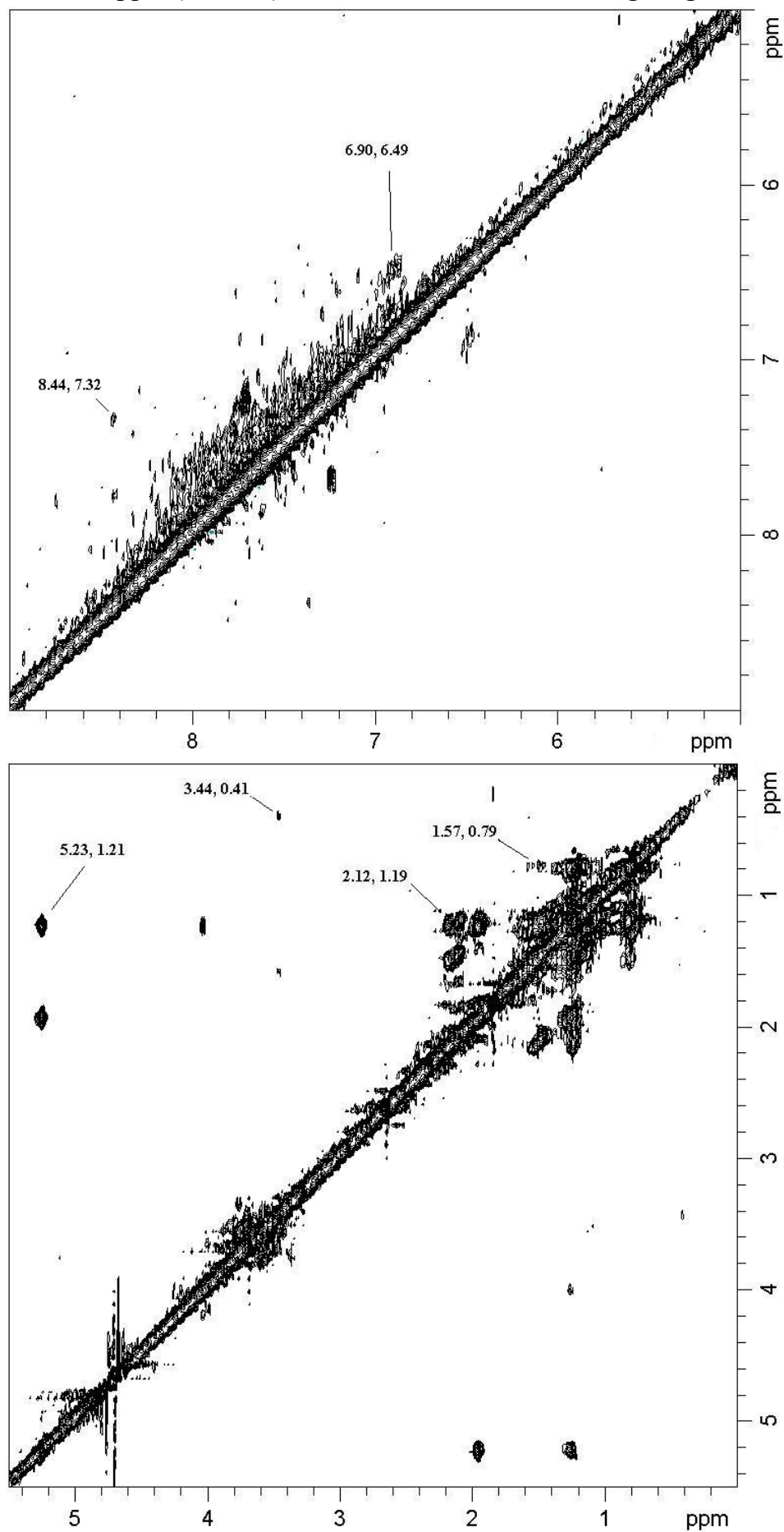
**Figura 5.41a:** Spettro HSQC di HA RES4 (Frazione 3) in NaOD



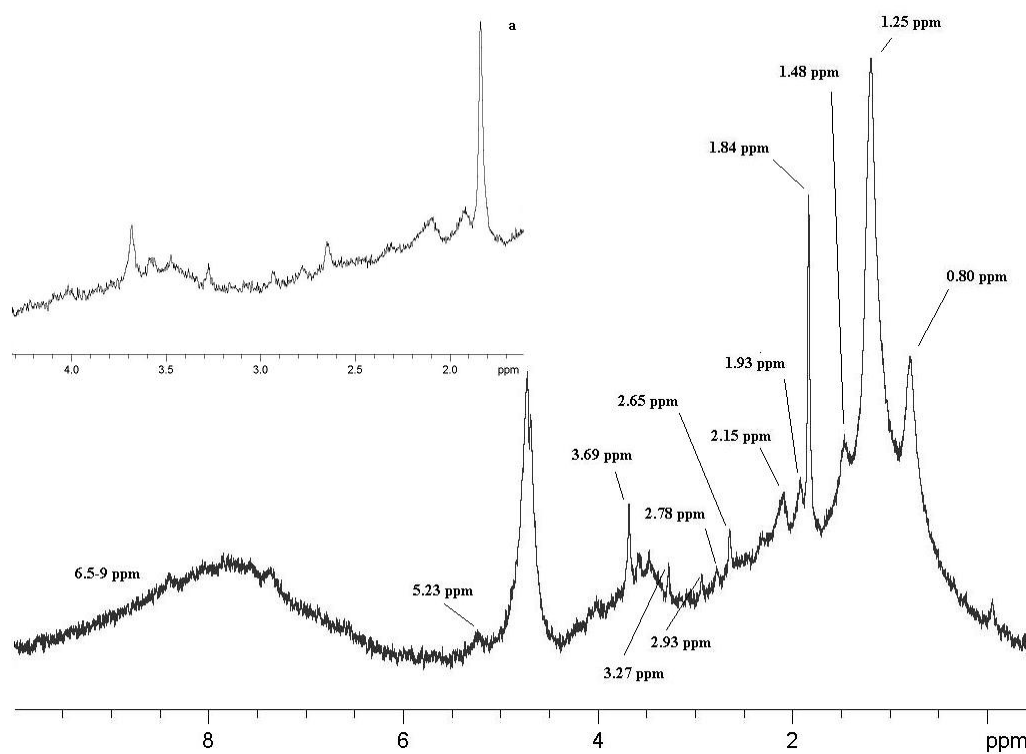
**Figura 5.41b:** Spettro COSY di HA RES4 (Frazione 3) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso)



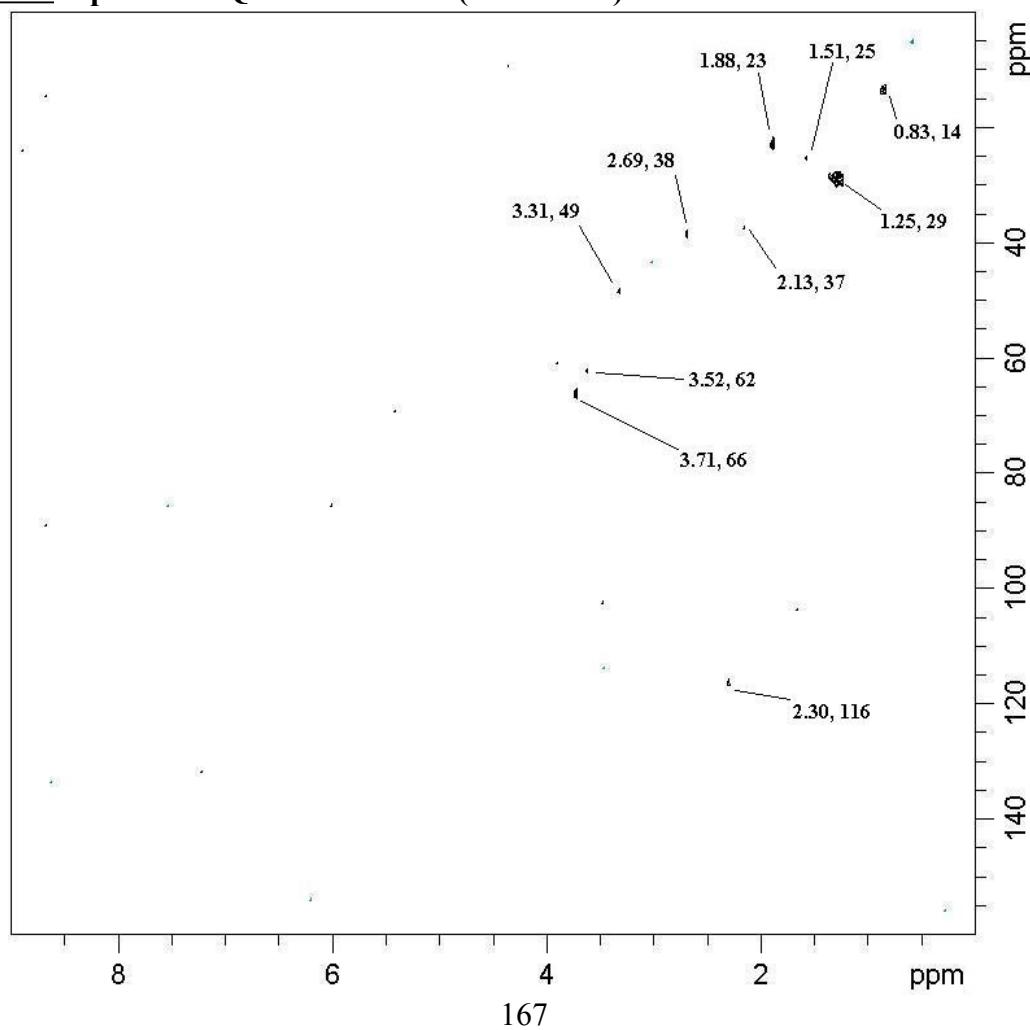
**Figura 5.41c:** Spettro TOCSY di HA RES4 (Frazione 3) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso), in evidenza le correlazioni *long range*



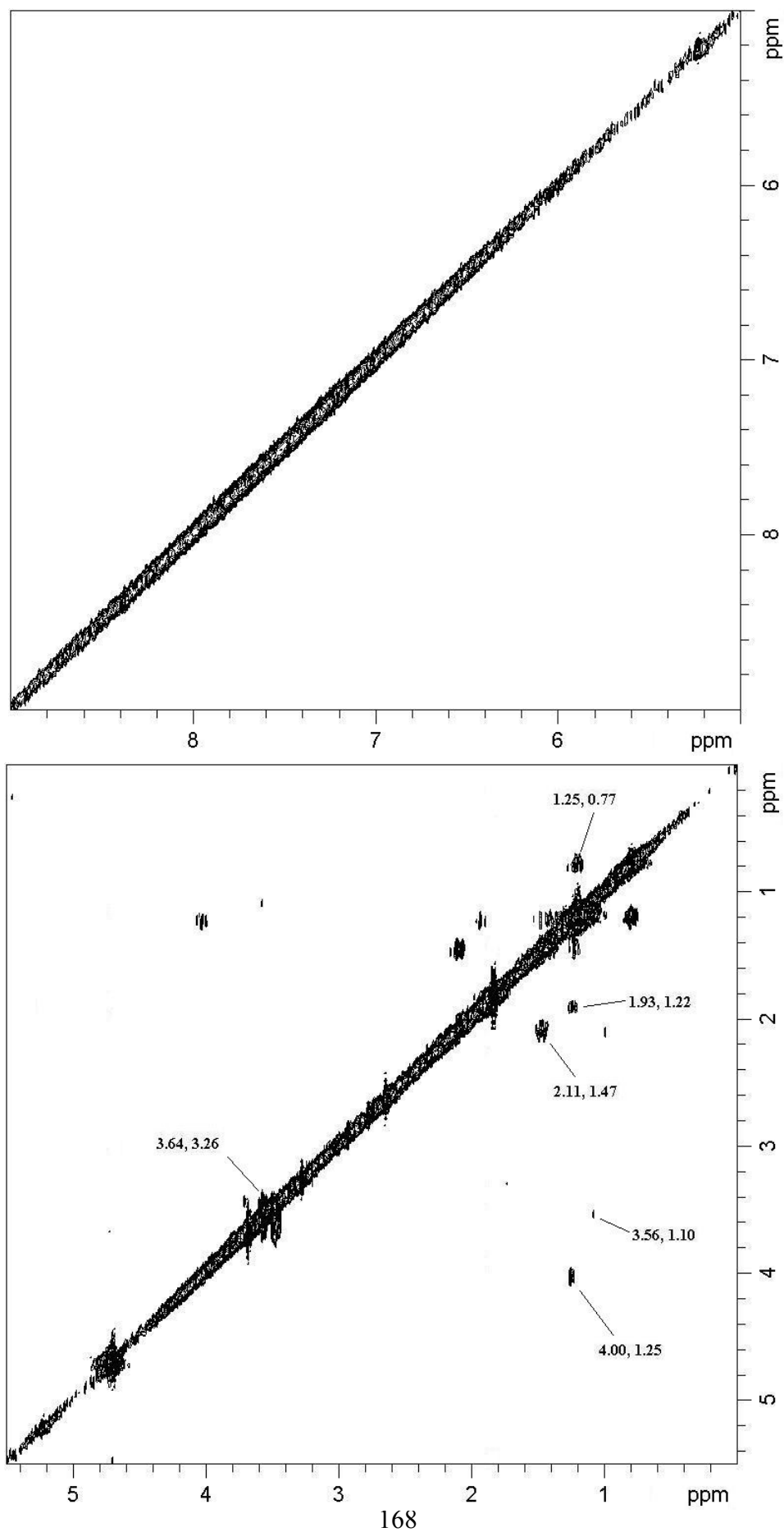
**Figura 5.42:** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR in NaOD di HA RES4 (Frazione 4) con ingrandimento (a)



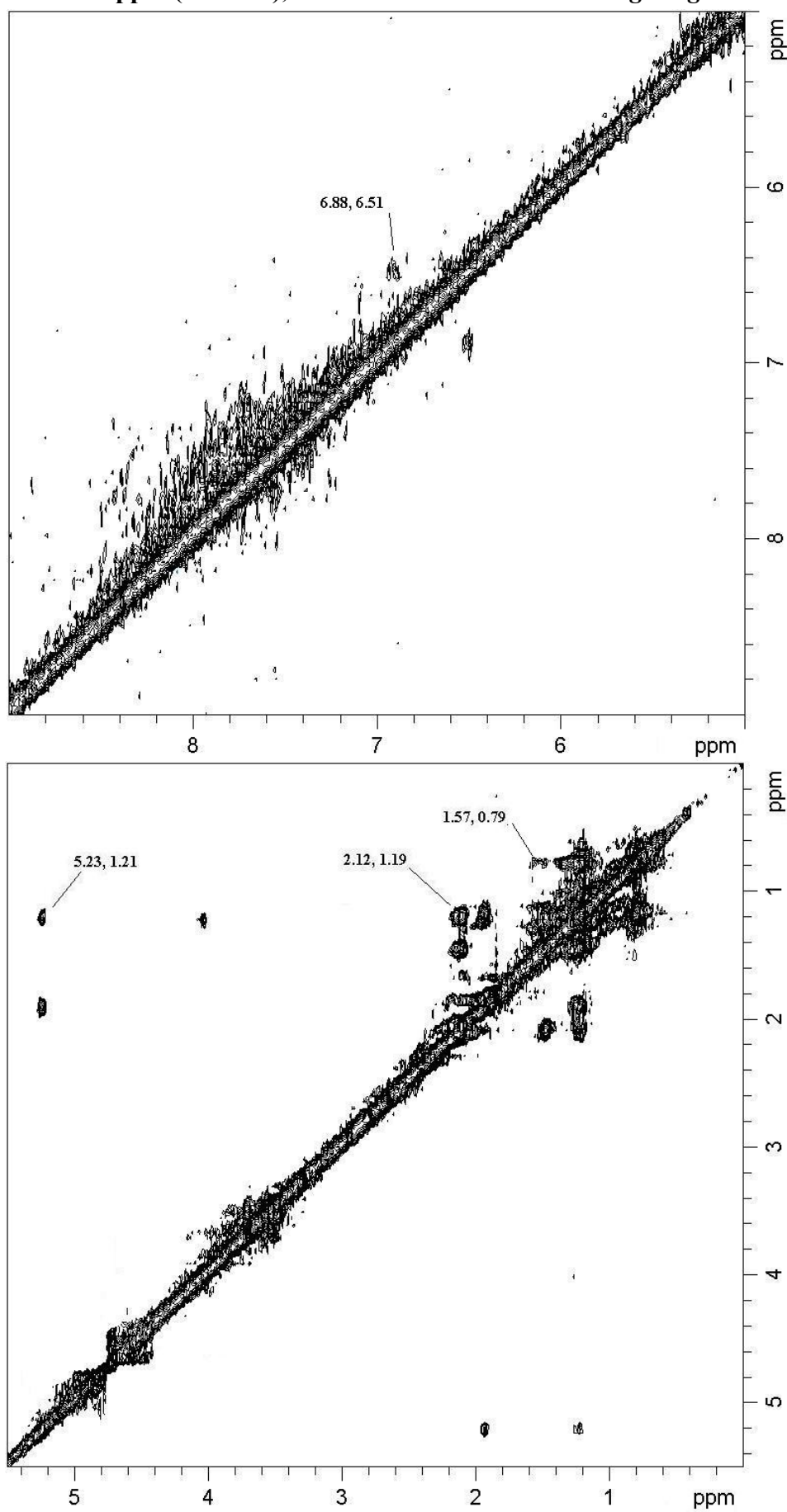
**Figura 5.43a:** Spettro HSQC di HA RES4 (Frazione 4) in NaOD



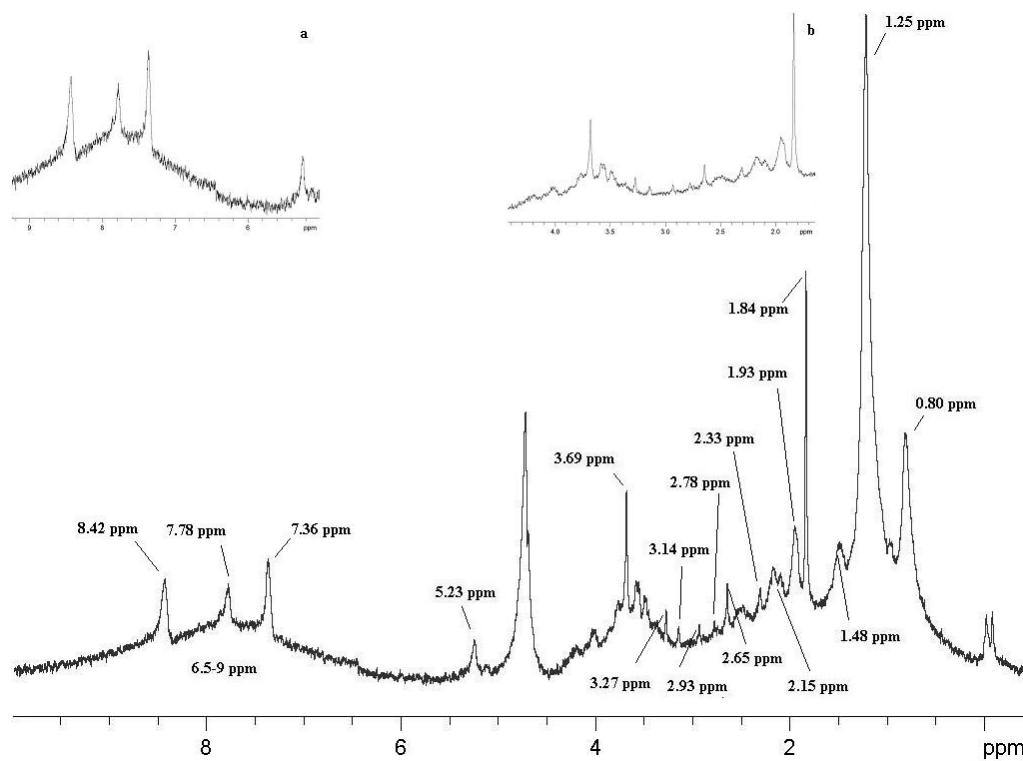
**Figura 5.43b:** Spettro COSY di HA RES4 (Frazione 4) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso)



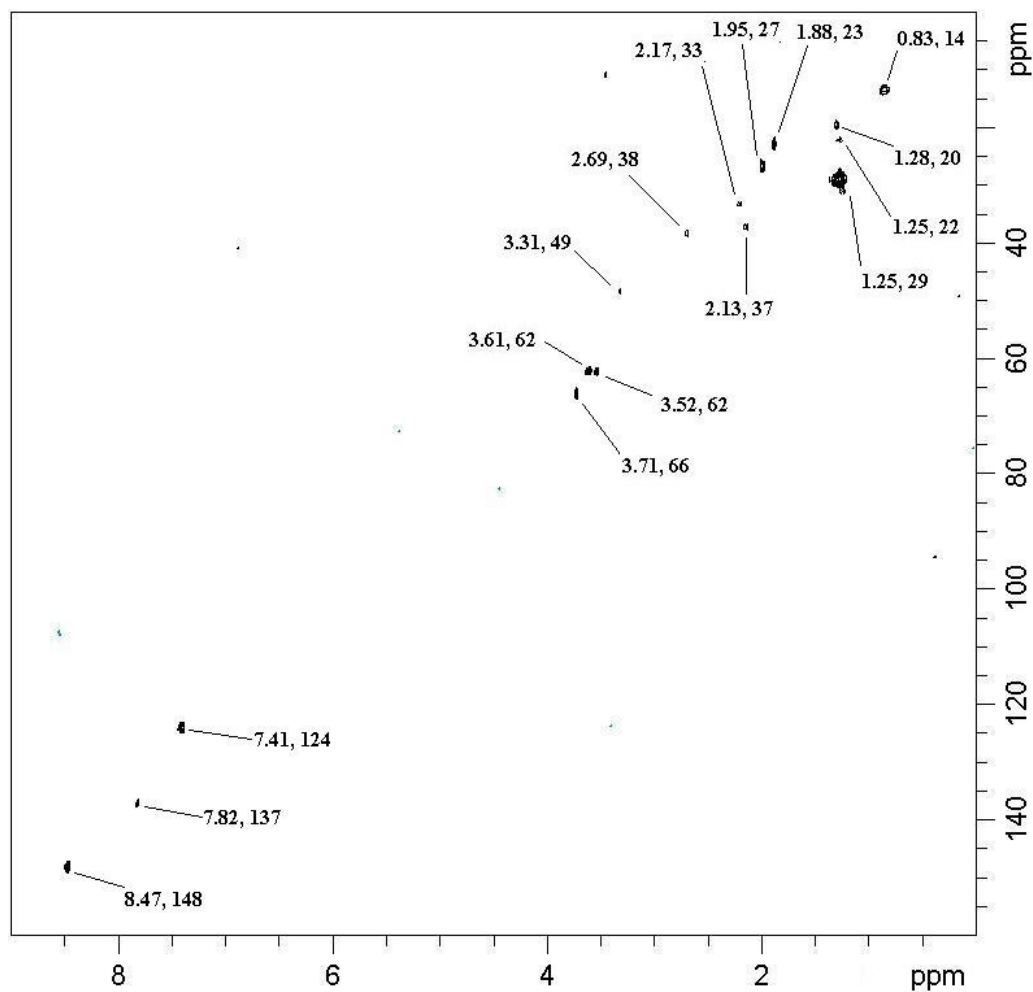
**Figura 5.43c:** Spettro TOCSY di HA RES4 (Frazione 4) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso), in evidenza le correlazioni *long range*



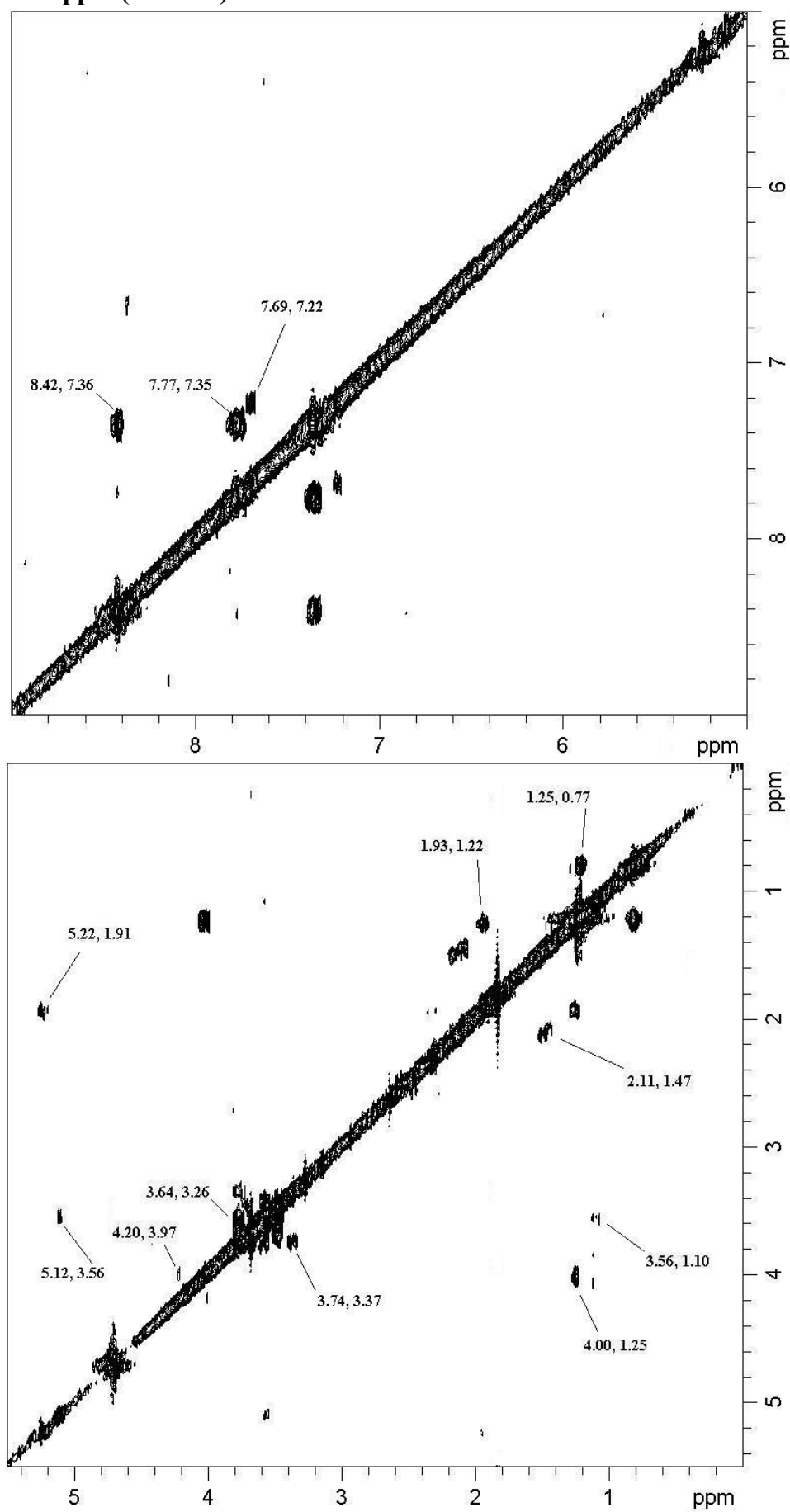
**Figura 5.44:** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR in NaOD di HA RES4 (Frazione 5) con ingrandimenti (a e b)



**Figura 5.45a:** Spettro HSQC di HA RES4 (Frazione 5) in NaOD

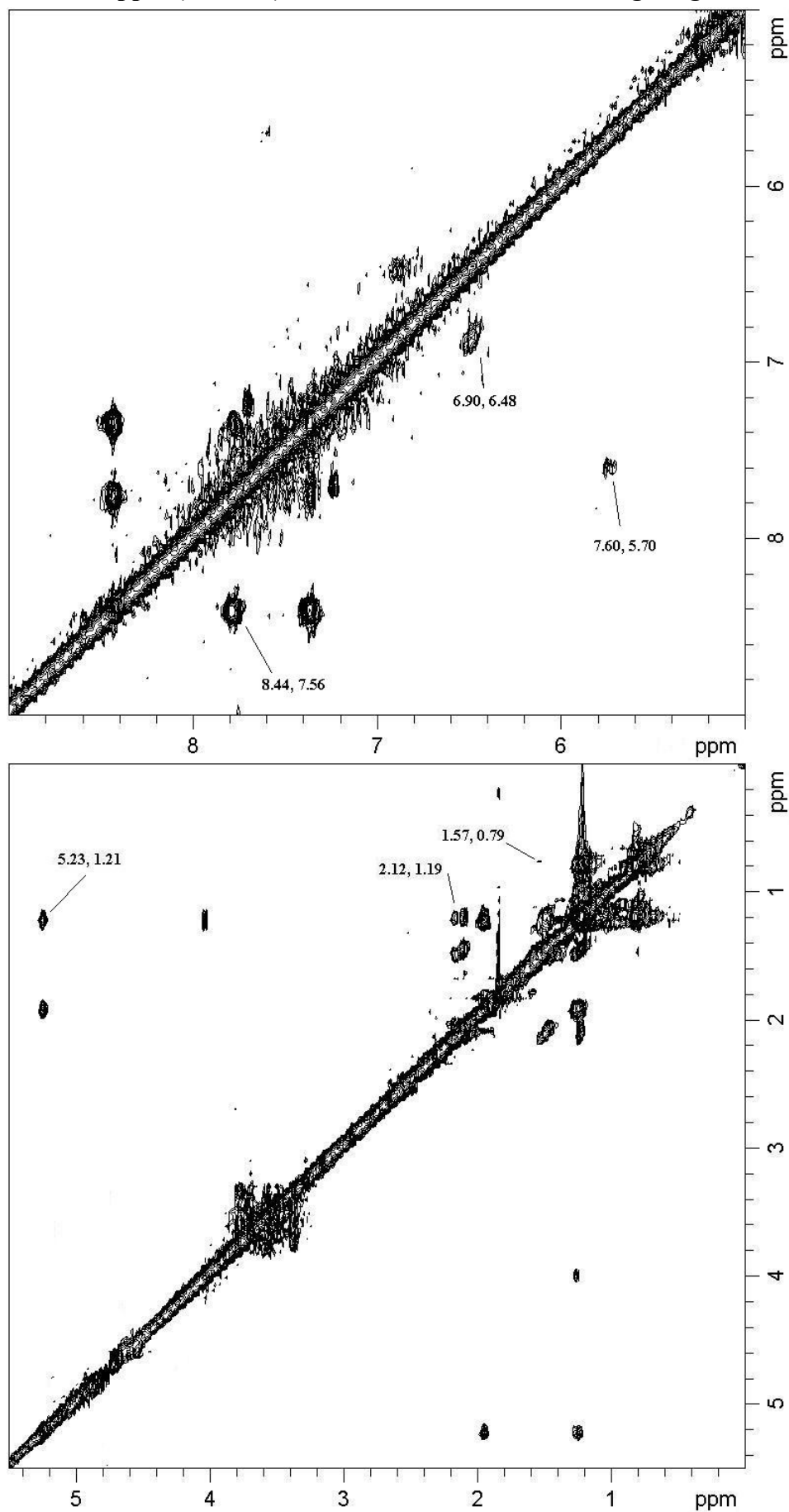


**Figura 5.45b:** Spettro COSY di HA RES4 (Frazione 5) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso)

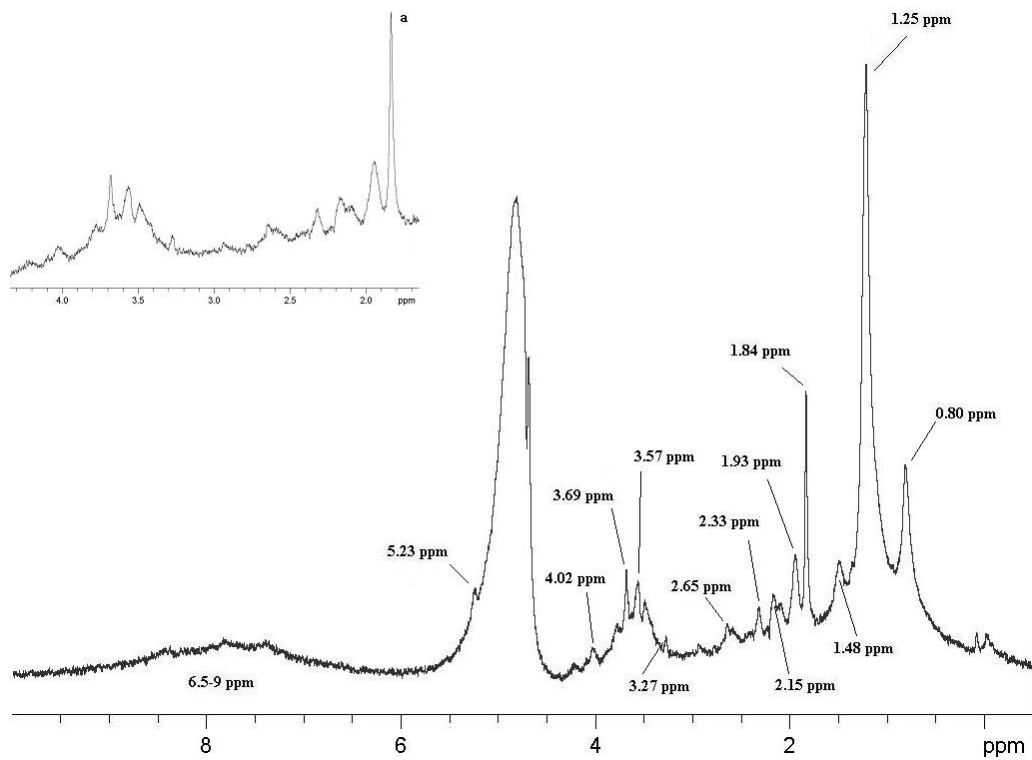




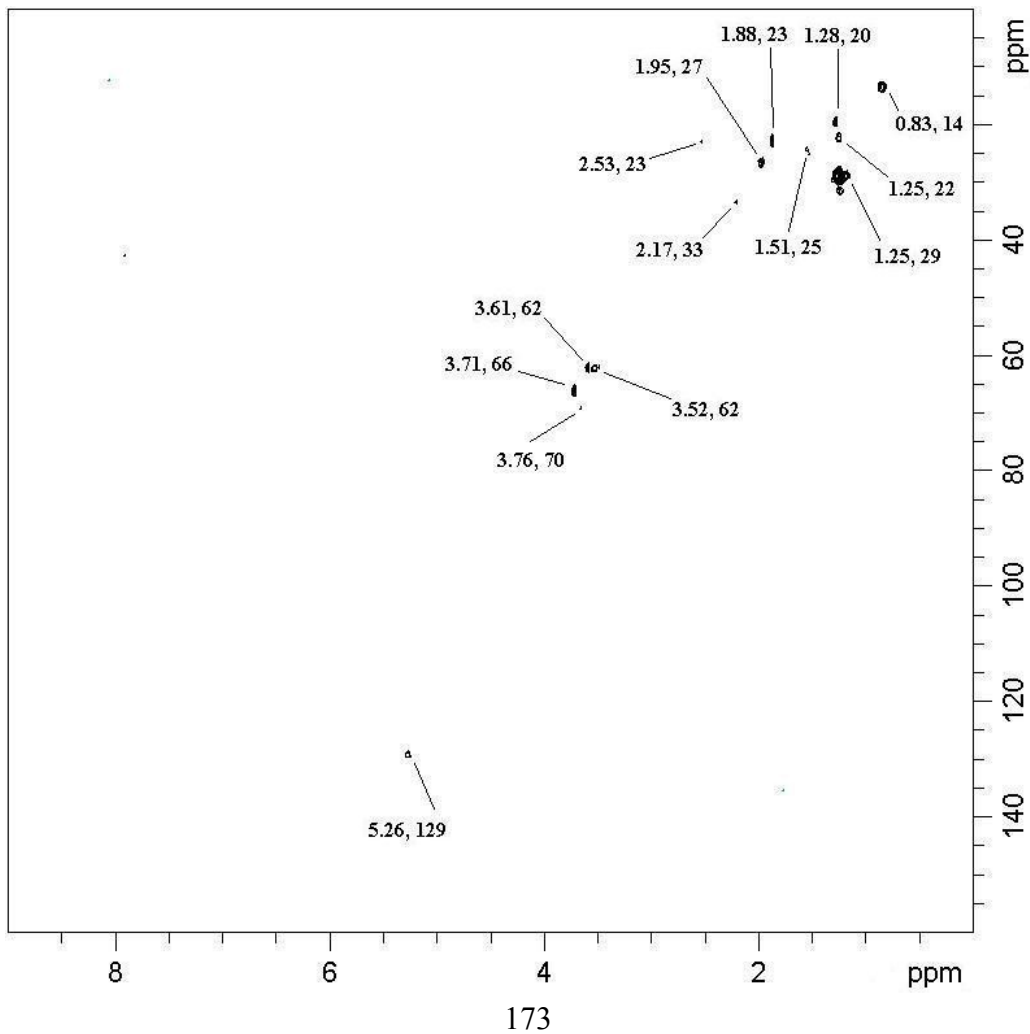
**Figura 5.45c:** Spettro TOCSY di HA RES4 (Frazione 5) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso), in evidenza le correlazioni *long range*



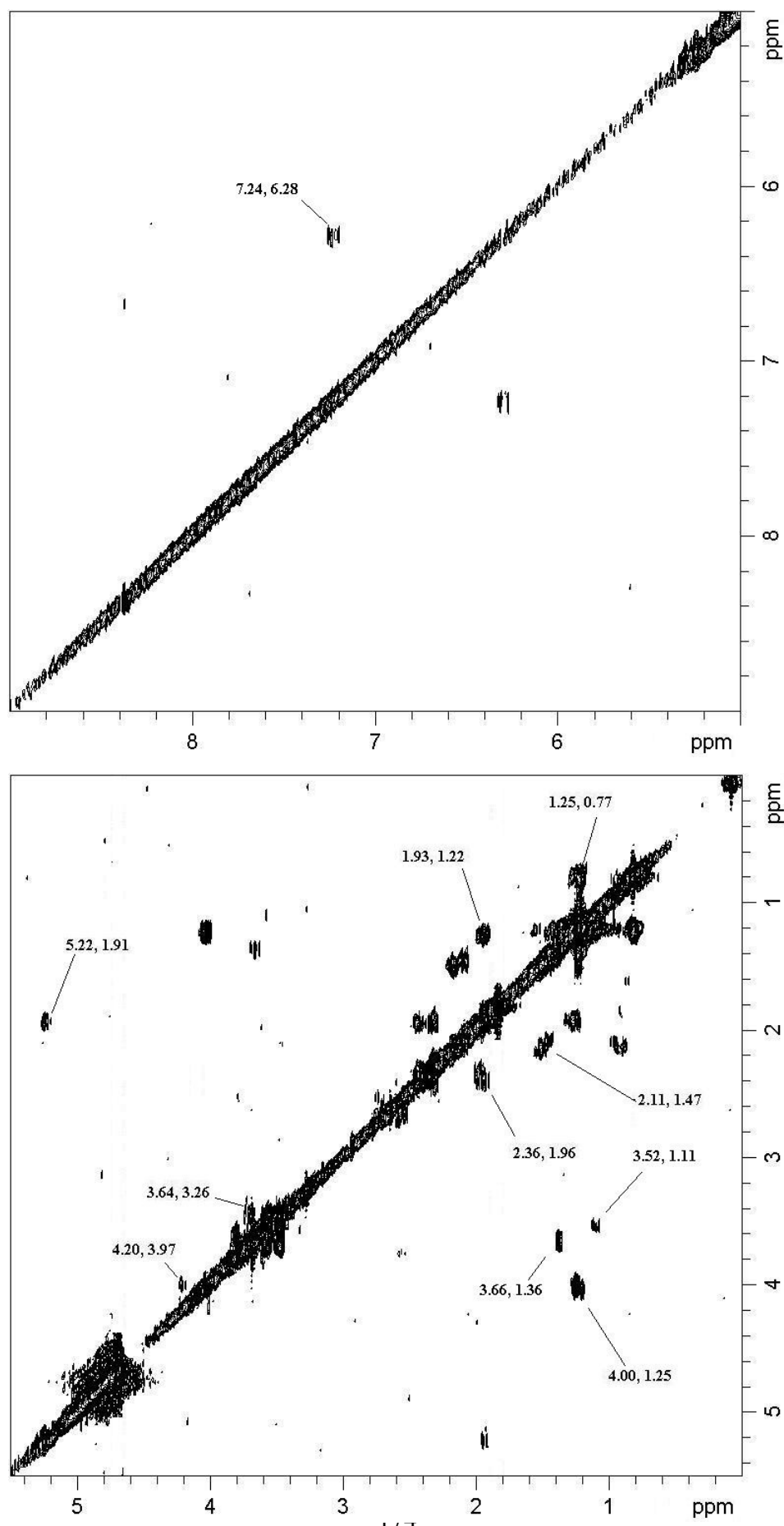
**Figura 5.46:** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR in NaOD di HA RES4 (Frazioni 6+7) con ingrandimento (a)



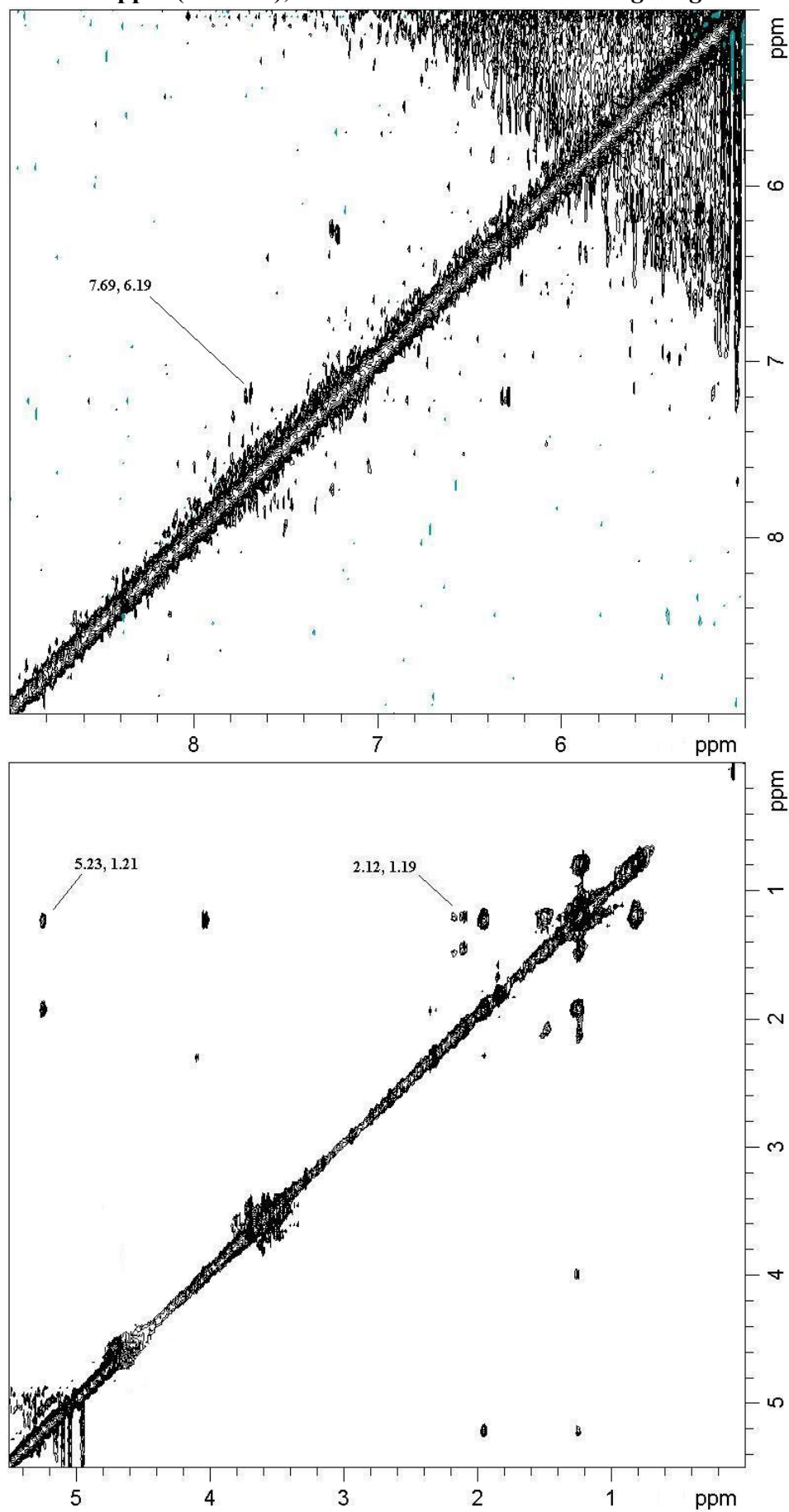
**Figura 5.47a:** Spettro HSQC di HA RES4 (Frazioni 6+7) in NaOD



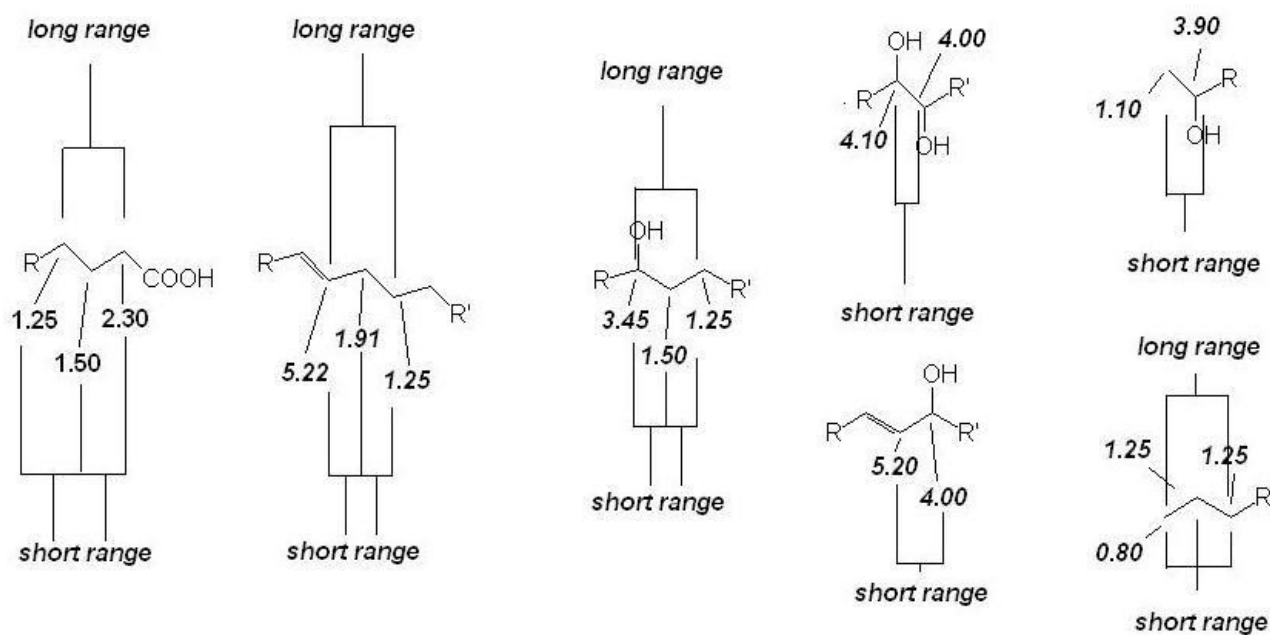
**Figura 5.47b:** Spettro COSY di HA RES4 (Frazioni 6+7) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso)



**Figura 5.47c:** Spettro TOCSY di HA RES4 (Frazioni 6+7) in NaOD, regione 5.0-9.0 ppm (in alto) e regione 0.0-5.5 ppm (in basso), in evidenza le correlazioni *long range*



**Figura 5.48:** Sistemi di spin che caratterizzano HA RES4 e le relative Frazioni HPSEC con evidenziate le correlazioni a supporto (valori in ppm)



**Tabella 5.19:** Riassunto dei segnali e delle relative correlazioni NMR (ppm): HA RES4 (bulk)

Segnali 1D $^1\text{H}$ -NMR	Cross peaks		
	$J^1_{\text{H-C}}$	$J^{2-3}_{\text{H-H}}$	$J^{\text{long range}}_{\text{H-H}}$
6-9.5	4.06, 68	7.25, 6.23	4.00, 2.36
4.03	1.24, 28	6.90, 6.49	2.12, 1.19
3.68	3.72, 66	4.00, 1.25	1.57, 0.79
2.32	2.38, 30	3.85, 1.13	
1.83	2.28, 32	3.64, 3.26	
1.25	1.87, 23	3.63, 3.26	
	1.28, 68	3.56, 1.10	
	1.28, 20	3.21, 1.14	
	1.52, 26	2.56, 2.17	
	0.82, 13	2.36, 1.96	
	0.82, 4	2.11, 1.47	

**Tabella 5.20: Riassunto dei segnali e delle relative correlazioni NMR (ppm): HA RES4 (Fraz.1)**

Segnali 1D $^1\text{H}$ -NMR	Cross peaks		
	$J^1_{\text{H-C}}$	$J^{2-3}_{\text{H-H}}$	$J^{\text{long range}}_{\text{H-H}}$
6.5-9	5.26, 129	7.70, 7.19	8.44, 7.36
5.23	4.09, 68	7.54, 7.33	5.23, 1.21
3.69	3.71, 66	7.25, 6.23	3.44, 0.41
3.27	3.62, 57	6.90, 6.49	2.12, 1.19
2.65	3.61, 62	5.22, 1.91	1.57, 0.79
2.33	3.52, 62	5.10, 3.99	
2.15	3.31, 49	4.20, 3.97	
1.93	3.29, 57	4.00, 1.25	
1.84	2.69, 38	3.85, 1.13	
1.48	2.17, 33	3.64, 3.26	
1.25	2.13, 37	3.63, 3.26	
0.80	1.95, 27	3.56, 1.10	
	1.88, 23	3.47, 2.16	
	1.51, 25	3.44, 1.56	
	1.28, 20	3.36, 2.75	
	1.25, 29	3.21, 1.14	
	1.25, 22	2.56, 2.17	
	1.18, 19	2.52, 1.40	
	1.13, 16	2.48, 0.93	
	0.85, 11	2.36, 1.96	
	0.83, 14	2.11, 1.47	
		1.93, 1.22	
		1.59, 0.40	
		1.48, 1.21	
		1.25, 0.77	

**Tabella 5-21: Riassunto dei segnali e delle relative correlazioni NMR (ppm): HA RES4 (Fraz.2)**

Segnali 1D $^1\text{H}$ -NMR	Cross peaks		
	$J^1_{\text{H-C}}$	$J^{2-3}_{\text{H-H}}$	$J^{\text{long range}}_{\text{H-H}}$
6.5-9	5.26, 129	7.24, 6.24	8.33, 7.36
5.23	4.09, 68	6.91, 6.50	7.70, 7.22
3.69	3.71, 66	5.22, 1.91	5.23, 1.21
3.27	3.61, 62	4.20, 3.97	3.44, 0.41
2.65	3.52, 62	4.00, 1.25	2.12, 1.19
2.33	3.29, 57	3.85, 1.13	1.57, 0.79
2.15	2.69, 38	3.64, 3.26	
1.93	2.17, 33	3.63, 3.26	
1.84	1.95, 27	3.56, 1.10	
1.48	1.88, 23	3.21, 1.14	
1.25	1.51, 25	2.56, 2.17	
0.80	1.28, 20	2.52, 1.40	
	1.25, 29	2.36, 1.96	
	1.25, 22	2.11, 1.47	
	0.83, 14	1.93, 1.22	
	2.13, 37	1.59, 0.40	
		1.48, 1.21	
		1.25, 0.77	

**Tabella 5.22: Riassunto dei segnali e delle relative correlazioni NMR (ppm): HA RES4 (Fraz.3)**

Segnali 1D $^1\text{H}$ -NMR	<i>Cross peaks</i>		
	$J^1_{\text{H-C}}$	$J^{2-3}_{\text{H-H}}$	$J^{\text{long range}}_{\text{H-H}}$
6.5-9	5.26, 129	7.70, 7.19	8.44, 7.32
5.23	3.71, 66	5.22, 1.91	6.90, 6.49
3.69	3.61, 62	4.20, 3.97	5.23, 1.21
3.27	3.31, 49	4.00, 1.25	3.44, 0.41
2.93	2.69, 38	3.64, 3.26	2.12, 1.19
2.78	2.17, 33	3.56, 1.10	1.57, 0.79
2.65	2.13, 37	2.48, 0.93	
2.33	1.95, 27	2.11, 1.47	
1.93	1.88, 23	1.93, 1.22	
1.84	1.51, 25	1.59, 0.40	
1.48	1.28, 20	1.48, 1.21	
1.25	1.25, 29	1.25, 0.77	
1.00	1.25, 22		
0.80	1.00, 13		
	0.83, 14		

**Tabella 5.23: Riassunto dei segnali e delle relative correlazioni NMR (ppm): HA RES4 (Fraz.4)**

Segnali 1D $^1\text{H}$ -NMR	<i>Cross peaks</i>		
	$J^1_{\text{H-C}}$	$J^{2-3}_{\text{H-H}}$	$J^{\text{long range}}_{\text{H-H}}$
6.5-9	3.71, 66	4.00, 1.25	6.88, 6.51
5.23	3.52, 62	3.64, 3.26	5.23, 1.21
3.69	3.31, 49	3.56, 1.10	2.12, 1.19
3.27	2.69, 38	2.11, 1.47	1.57, 0.79
2.93	2.13, 37	1.93, 1.22	
2.78	1.88, 23	1.25, 0.77	
2.65	1.51, 25		
2.15	1.25, 29		
1.93	0.83, 14		
1.84			
1.48			
1.25			
0.80			

**Tabella 5.24: Riassunto dei segnali e delle relative correlazioni NMR (ppm): HA RES4 (Fraz.5)**

Segnali 1D $^1\text{H}$ -NMR	Cross peaks		
	$J^1_{\text{H-C}}$	$J^{2-3}_{\text{H-H}}$	$J^{\text{long range}}_{\text{H-H}}$
8.42	8.47, 148	8.42, 7.36	8.44, 7.56
7.78	7.82, 137	7.77, 7.35	7.60, 5.70
7.36	7.41, 124	7.69, 7.22	6.90, 6.48
6.5-9	3.71, 66	5.22, 1.91	5.23, 1.21
5.23	3.61, 62	5.12, 3.56	2.12, 1.19
3.69	3.52, 62	4.20, 3.97	1.57, 0.79
3.27	3.31, 49	4.00, 1.25	
3.14	2.69, 38	3.74, 3.37	
2.93	2.17, 33	3.64, 3.26	
2.78	2.13, 37	3.56, 1.10	
2.65	1.95, 27		
2.33	1.88, 23		
2.15	1.28, 20		
1.93	1.25, 29		
1.84	1.25, 22		
1.48	0.83, 14		
1.25			
0.80			

**Tabella 5.25: Riassunto dei segnali e delle relative correlazioni NMR (ppm): HA RES4 (Frazioni 6+7)**

Segnali 1D $^1\text{H}$ -NMR	Cross peaks		
	$J^1_{\text{H-C}}$	$J^{2-3}_{\text{H-H}}$	$J^{\text{long range}}_{\text{H-H}}$
6-9.5	5.26, 129	7.24, 6.28	7.69, 6.19
5.23	3.76, 70	5.22, 1.91	5.23, 1.21
4.02	3.71, 66	4.20, 3.97	2.12, 1.19
3.69	3.61, 62	4.00, 1.25	
3.57	3.52, 62	3.66, 1.36	
3.27	2.53, 23	3.64, 3.26	
2.65	2.17, 33	3.52, 1.11	
2.33	1.95, 27	2.36, 1.96	
2.15	1.88, 23	2.11, 1.47	
1.93	1.51, 25	1.93, 1.22	
1.84	1.28, 20	1.25, 0.77	
1.48	1.25, 29		
1.25	1.25, 22		
0.80	0.83, 14		



#### 5.14.6 RES4: Spettroscopia NMR in soluzione: Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)

La capacità di misurare la tendenza a diffondere di una molecola nel mezzo di analisi (soluzioni acquose) costituisce un grande vantaggio della spettroscopia NMR, in particolar modo nelle applicazioni su materiali umici. Tutte le sostanze in soluzione tendono a diffondere in funzione dell'energia cinetica seguendo moti casuali (Browniani). Tuttavia, in funzione di un gradiente di campo magnetico lineare, le molecole hanno una risposta diversa a seconda della loro posizione relativa al campo magnetico applicato, permettendo di valutare la loro singola diffusione. La tendenza a diffondere infatti è inversamente proporzionale al raggio idrodinamico di una molecola o di un aggregato supramolecolare, e risulta anche utile a rivelarne alcune dinamiche molecolari in soluzione. Nella fattispecie, questa tecnica applicata alla sostanza HA **RES4** e alle sue **Frazioni 1-7** mette in risalto alcune caratteristiche di notevole interesse. La rappresentazione grafica di un esperimento DOSY mette in relazione, con un'operazione algoritmica, ciascun *chemical shift* con il logaritmo decimale del coefficiente di diffusione (D) misurato in m<sup>2</sup>/s associato alla molecola a cui appartiene.

Nelle **Figure 5.49a-g** sono illustrati i risultati per HA **RES4** e **Frazioni 1-7**. È stato introdotto un riferimento sull'asse y per il peso molecolare (PM) approssimativo dei segnali. L'aspetto del materiale intero **RES4** è molto meno articolato delle sue frazioni, si nota infatti come i segnali siano molto meno dispersi nell'asse delle ordinate. Il gruppo dei segnali aromatici forma una larga banda con un intervallo di Log D compreso tra -9.9 e -10.1. Nel materiale intero **RES4**, esso è composto da un gruppo di segnali intorno a 7.0 ppm a più bassa diffusione, corrispondenti a PM di poco sotto i 3000 Da circa, mentre i segnali intorno a 8.0 ppm sono decisamente più mobili, con PM apparenti poco sopra i 2000 Da. Nelle frazioni questa tendenza è meno marcata, infatti il largo segnale tra 6.5 e 8.5 ppm vede aumentare poco la sua diffusività, e il PM apparente medio è di circa 2500 Da. Osservando la parte destra delle immagini DOSY si può avere un'ulteriore conferma.

Nello spettro associato al materiale intero **RES4** (**Figura 5.49a**) i segnali aromatici intorno a 7.0 ppm popolano la sezione derivata più in alto, quelli intorno a 8.0 ppm si rilevano nelle sezioni derivate in basso. La stessa situazione non si registra per le **Frazioni 1-7**, in cui tutta la banda aromatica si distribuisce soprattutto nelle sezioni derivate inferiori, ovvero con Log D tra -10.0 e -9.9 (**Figure 5.49b-g**).

Nelle **Frazioni 1 e 2** (**Figure 5.49b-c**) e **Frazione 5** (**Figura 5.49f**), inoltre, si apprezzano dei protoni aromatici, rispettivamente a ppm 7.54-7.53 e 8.44-7.77-7.76, che si distinguono dal resto con valori vicini a 10.000 Da nel primo caso, e sotto i 400 nel secondo. Questi segnali sono stati descritti in dettaglio nel paragrafo precedente. Queste molecole a struttura aromatica, dopo la separazione HPSEC, si sono riorganizzate nella struttura supramolecolare in modo imperfetto, ed i loro segnali rimangono discostati dal rumore di fondo.

Nelle regioni spettrali a campi più alti l'effetto della separazione è più evidente, ma ha un andamento opposto. Ciò si evince dal confronto dello spettro del materiale intero **RES4** con quelli delle **Frazioni 1-7**. Nel primo, infatti, i composti alchilici e idrossialchilici sono organizzati in aggregati con un PM tra 1000 e 2500 Da. In questo intervallo sembra che le sostanze ossidrilate (>3.0 ppm) sono dotate di diffusione lievemente maggiore degli acidi non funzionalizzati. Dopo la separazione di questo materiale in HPSEC, invece, questa differenza è diventata notevole. Infatti, gli acidi grassi, caratterizzati dai segnali a 0.80, 1.25, 1.50 e 2.30 ppm, sono dotati di scarsa diffusività in virtù del loro PM superiore a 10.000 Da, mentre le molecole ossidrilate diffondono di più rivelando PM<500 Da. Questo fenomeno è apprezzabile anche analizzando le sezioni derivate nella parte destra delle **Figure 5.49a-g**. Negli spettri in alto (bassa diffusione), infatti, si registrano prevalentemente i segnali più schermati, al contrario di quanto avviene per gli spettri in basso (alta diffusione) popolati da protoni prossimi a gruppi ossidrili.

La **Tabella 5.26** razionalizza la distribuzione dei pesi molecolari in funzione della regione spettrale.

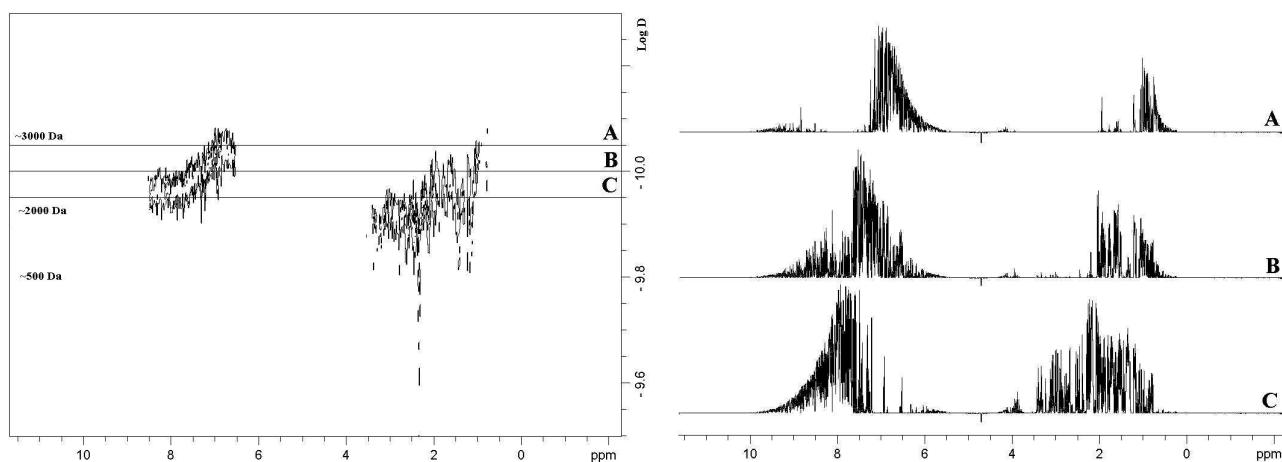
Il comportamento osservato per questo residuo di lavorazione di HA (**RES4**) è una prova della natura supramolecolare di tali sostanze. Infatti, le molecole eluite in HPSEC non subiscono modifiche chimiche, ma il loro volume idrodinamico cambia unicamente per un effetto di riorganizzazione dell'architettura degli aggregati in cui sono stabilizzate. Prima della separazione HPSEC si misura la diffusività di una molecola in un contesto eterogeneo, che è risultante di una moltitudine di interazioni. Dopo la separazione HPSEC, si misura la diffusività delle frazioni separate in un contesto molto più omogeneo, in cui ci si avvicina alle caratteristiche specifiche delle specie in assenza di interazioni.

**Tabella 5.26: Valori approssimativi di peso molecolare (Da) ordinati per regioni spettrali per HA RES4 e Frazioni 1-7 in esperimenti DOSY in NaOD (0.4 g/L)**

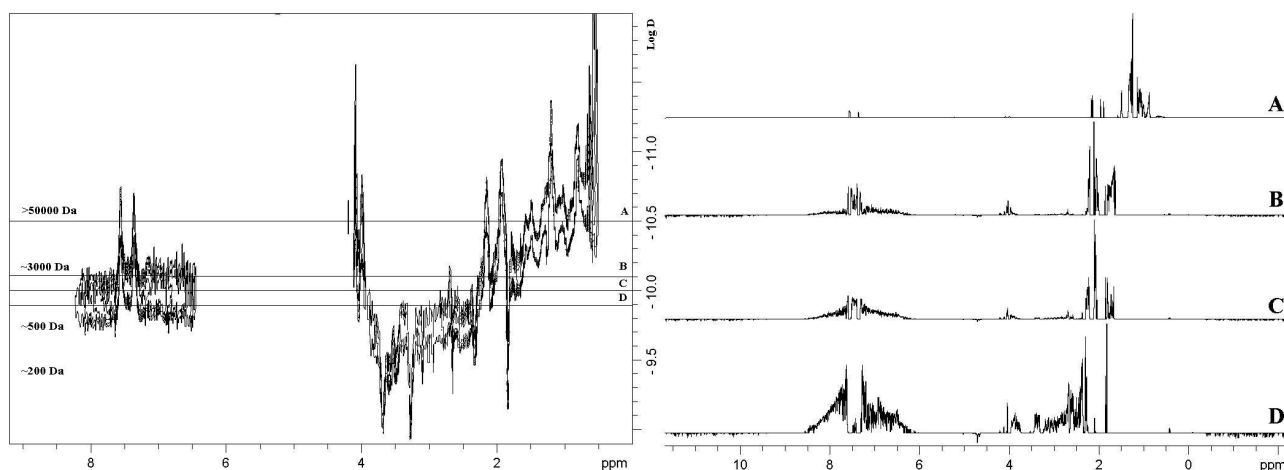
Regione spettrale (ppm)	Aromatici (7.5-8.5 ppm)	Aromatici (6.5-7.5 ppm)	Acidi ossidrilati	Acidi grassi
Res4 Bulk	2000	3000	1500	2500
Frazioni 1-7	2500	2500	500	>10000

**Figure 5.49a-g: Spettri DOSY di HA RES4 e frazioni 0.4 g/L in NaOD (x=ppm y=LogD con riferimenti al PM in Dalton, a sinistra) con estrapolazione monodimensionale delle righe evidenziate (a destra)**

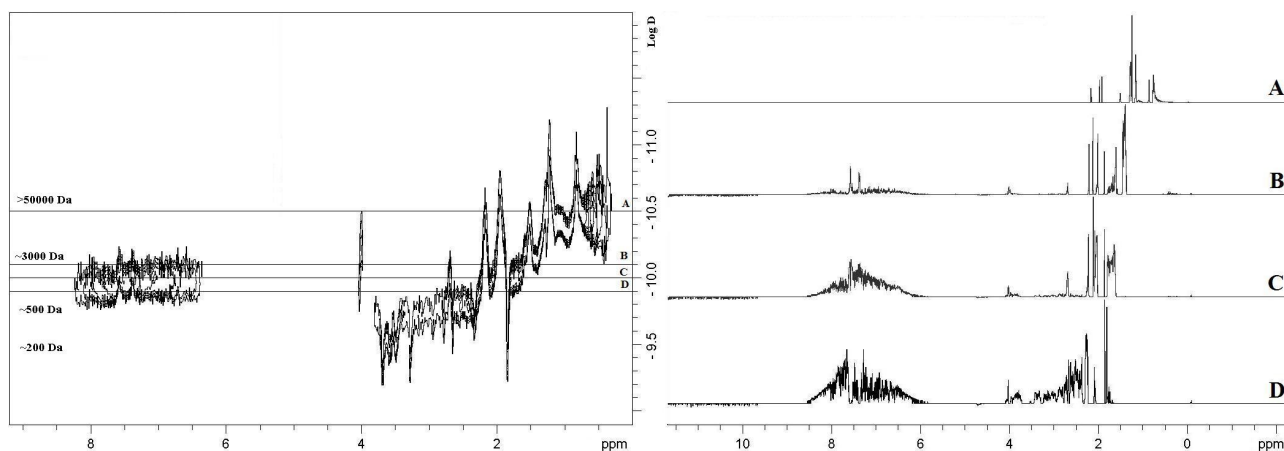
**Figura 5.49a: HA RES4 (bulk)**



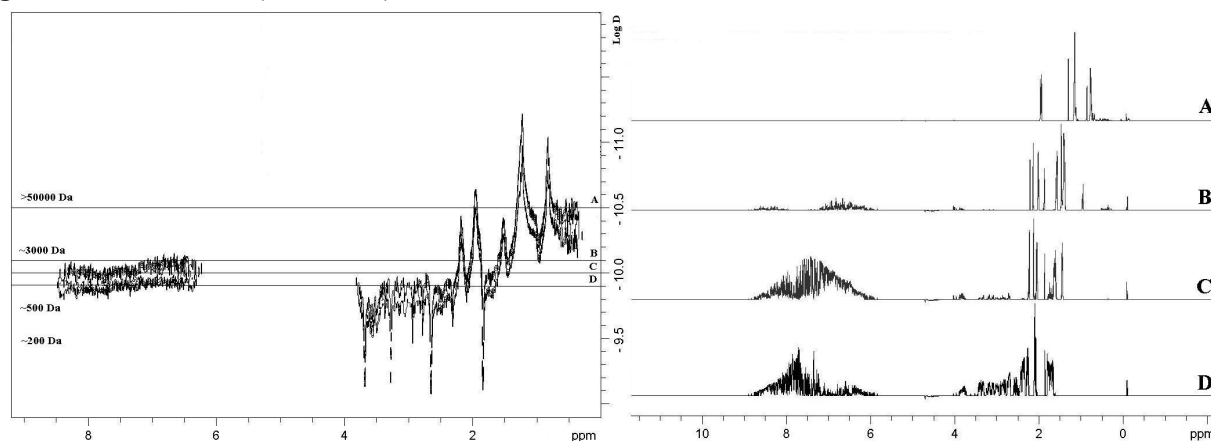
**Figura 5.49b: HA RES4 (Frazione 1)**



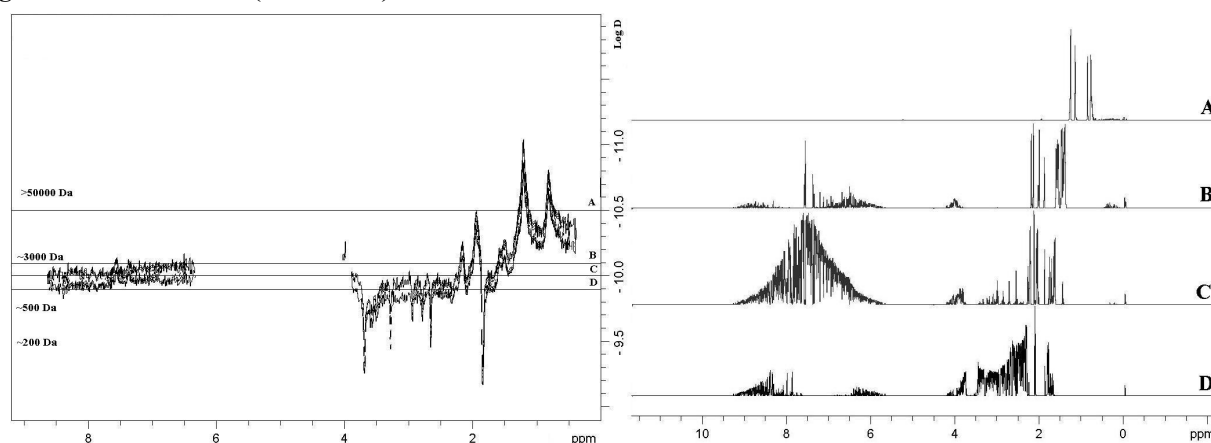
**Figura 5.49c: HA RES4 (Frazione 2)**



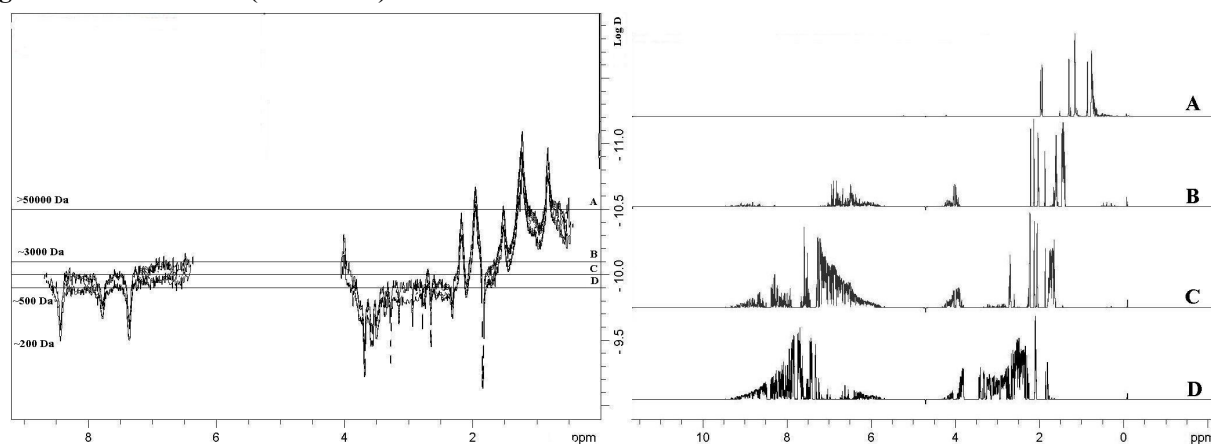
**Figura 5.49d: HA RES4 (Frazione 3)**



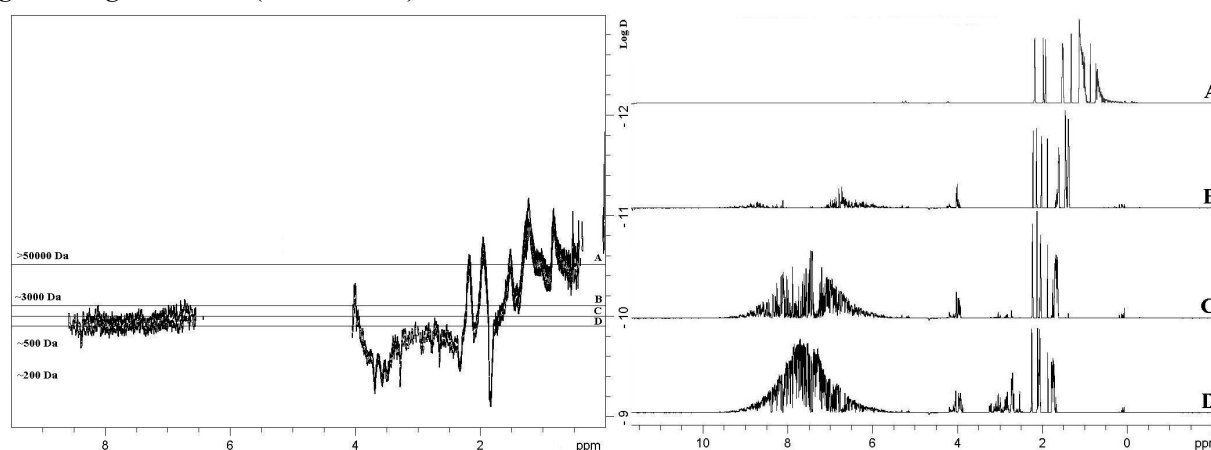
**Figura 5.49e: HA RES4 (Frazione 4)**



**Figura 5.49f: HA RES4 (Frazione 5)**



**Figura 5.49g: HA RES4 (Frazioni 6+7)**



## CAPITOLO 6

### ANALISI NMR DI COMPLESSI METALLO-UMICI

#### 6.1 Introduzione

Le sostanze umiche sono in grado di interagire con le specie cariche positivamente come i cationi metallici (Tipping, 2002). Queste sostanze sono dotate di molti gruppi ionizzabili in grado di stabilire un legame con specie cariche positivamente. Questo legame è costituito da un insieme di attrazioni coulombiane e legami di coordinazione, e le sue caratteristiche variano a seconda della specie metallica coinvolta (Kinniburgh *et al.*, 1998). E' di notevole interesse per comprendere la struttura delle sostanze umiche lo studio del comportamento della loro struttura supramolecolare in relazione alla formazione di un complesso metallo umico. A tale scopo, un acido umico da Lignite è stato trattato con quantità note di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  (vedi sezione sperimentale) e analizzato sotto il profilo di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare. Esperimenti di Variable Spin Lock (VSL) Cross Polarization-Magic Angle Spinning (CP-MAS) e Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) sono stati utilizzati per approfondire l'effetto della complessazione sull'architettura molecolare dell'HA. Gli esperimenti in questione infatti sono in grado di correlare ciascun segnale NMR con parametri chimici come la rigidità molecolare (VSL) e la diffusività ( $\text{Log } D$ ). L'andamento di queste grandezze è utile per delucidare in che misura la formazione del complesso ha influenzato i diversi gruppi funzionali.

#### 6.2 Risultati: Rigidità molecolare

La spettrometria CP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR è generalmente usata per caratterizzare la dinamica dei solidi a livello molecolare, essendo molto sensibile alla morfologia dei segmenti molecolari su scala

nanometrica (Stejskal & Memory, 1994). Il tempo di rilassamento spin lattice nel sistema di riferimento rotante  $T_{1\rho}(H)$ , è approssimato nello spazio su diverse decine di nanometri per via della diffusione di spin, e dipende dalla morfologia molecolare. Il valore di  $T_{1\rho}(H)$  misurato su un campione rappresenta il valore molare approssimato per entrambi i componenti amorfi e semi-cristallini del campione (McBrierty, 1989). Quando questa grandezza è misurata con esperimenti VSL, essa rappresenta una misura del decadimento dell'intensità per i segnali di tutti i carboni che legano protoni, per via dei processi di trasferimento di polarizzazione e di spostamento chimico. Di conseguenza, il valore di  $T_{1\rho}(H)$  per tutte le categorie di idrogeni permette di valutare la mobilità molecolare del campione. Dal momento che il valore di  $T_{1\rho}(H)$  è sensibile alla vicinanza reciproca di segmenti contenenti protoni, la distanza tra questi è correlata direttamente alla diffusione di spin da protone a protone (Newman & Condon, 1995). Di conseguenza, variazioni nella disposizione spaziale dei protoni della sostanza organica a seguito della formazione dei complessi metallo-umici possono essere rilevate da differenze nel valore di  $T_{1\rho}(H)$  in funzione del contenuto di metalli.

Se in apparenza lo spettro monodimensionale CP-MAS degli HA da Lignite non varia in modo significativo con la complessazione di Ca e Al (**Figura 6.1**), il valore di  $T_{1\rho}(H)$ , calcolato per l'intero spettro o per i tre principali intervalli di spostamento chimico (Regioni Carbossilica, Aromatica e Alifatica), ha prodotto un risultato significativamente diverso in funzione dell'aumento della complessazione da parte di Ca e Al (**Tabella 6.1**).

I tempi di rilassamento aumentano costantemente, anche se non linearmente, con il contenuto di entrambi Al e Ca, sia quando il valore di  $T_{1\rho}(H)$  è stato calcolato per l'intero spettro, che per le singole regioni. Il valore più basso è stato riscontrato per le regioni carbossiliche, esso tuttavia aumenta in modo per i complessi di alluminio fino a un valore superiore a 4 ms per il campione a maggior concentrazione (1%). Viceversa, il calcio ha un effetto su questa regione molto più limitato, mostrando un valore di appena 3.2 ms alla maggior concentrazione (1%). L'aumento del tempo di rilassamento con la coordinazione è rilevante anche per la regione aromatica/olefinica,

nonostante il valore già alto di  $T_{1\rho}$  (H) del campione di controllo. Anche in questo frangente, la complessazione con Al produce valori mediamente più alti che per Ca. I segnali più schermati (C-alifatici), attribuibili principalmente a catene di acidi grassi oltre che a piccoli acidi ossidrilati (Fiorentino *et al.*, 2006), mostrano il valore di  $T_{1\rho}$  (H) più alto nel campione di controllo, indicando che la conformazione di questa categoria di molecole negli HA è la più rigida. Anche per questa regione la rigidità molecolare aumenta in modo significativo con l'incremento progressivo della coordinazione di Al e Ca, anche se per l'alluminio il valore di  $T_{1\rho}$  (H) ha mostrato un aumento di uguale intensità per tutte le concentrazioni analizzate.

### 6.3 Risultati: Diffusione molecolare

La spettroscopia NMR DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy, è uno strumento utile per lo studio dell'aggregazione della sostanza organica naturale (Simpson *et al.*, 2001). Il DOSY è un esperimento NMR con gradiente di campo a impulsi che permette la misura della diffusione traslazionale delle molecole in soluzione. Il valore del coefficiente di diffusione indica, oltre che la dimensione e la forma molecolare nel suo complesso, anche informazioni dirette sulle dinamiche molecolari, incluse le interazioni molecolari, i fenomeni di aggregazione e i cambiamenti di conformazione (Johnson, 1999; Cohen *et al.*, 2005). I fenomeni di diffusione sono direttamente correlati al raggio idrodinamico della sostanza organica disciolta in soluzione, ovvero alle sue dimensioni molecolari (Smejvalova & Piccolo, 2008).

La proiezione bidimensionale dello spettro DOSY dell'acido umico di controllo e degli umati di Al e Ca a contenuto di metallo crescente sono mostrati in **Figure 6.2** e **6.3** rispettivamente. I coefficienti di diffusione calcolati per gli spettri DOSY per tre intervalli di spostamento chimico (H aromatici/olefinici, 5.0-9.0 ppm; H alchilici ossigenati, 2.0-4.5 ppm; H alifatici 0.0-2.0 ppm) sono riassunti nella **Tabella 6.2**.



La proiezione bidimensionale del campione di controllo mostra che la regione intorno a 6.0-8.0 ppm ha in media valori in negativo di  $\log D$  maggiori e, di conseguenza, volume di aggregazione più grande del resto dei protoni. L'aggiunta dello 0.05% di Al ha alterato la distribuzione dei coefficienti di diffusione per i protoni, suggerendo una diminuzione del volume molecolare per le sostanze con segnali tra gli intervalli 2.0-4.0 e 7.0-8.0 ppm, mentre le componenti con i segnali tra 0.0 e 2.0 mostrano un incremento nelle dimensioni molecolari (**Figura 6.2**). L'aggiunta di 0.1% di Al aumenta i valori in negativo di  $\log D$  per gli intervalli 0.0-2.0 e 6.0-7.0 ppm, indicando un incremento del volume molecolare dell'HA, mentre i protoni aromatici nell'intervallo 7.0-8.0 ppm si comportano come particelle di dimensioni più ridotte. La complessazione con 0.25% di Al mostra una tendenza a ri-associarsi da parte delle molecole a dimensioni minori, anche se i segnali a campo più basso indicano comunque una diffusione più lenta. A questa concentrazione di Al, i protoni alchilici, inoltre, sembrano diffondere in associazioni più voluminose che per i campioni Al 0.05% e controllo. Un ulteriore aumento di Al a 0.5% e 1.0% non influisce in modo significativo le proiezioni spettrali degli umati, con le eccezioni della diminuzione del segnale a 3.7 ppm e dell'aumento di volume per i protoni nell'intervallo 0.5-1.5 ppm. La coordinazione con Ca allo 0.05% ha prodotto risultati simili che per Al, tuttavia un incremento più consistente negli intervalli tra 0.0-1.2 e 6.0-7.0 ppm è riscontrabile a paragone con il controllo (**Figura 6.3**). L'addizione di maggior quantità di Ca influenza solo marginalmente le proiezioni bidimensionali degli umati di Ca, i quali mostrano comunque valori di dimensioni molecolari negli intervalli 0.0-1.2 e 6.0-7.0 ppm maggiori rispetto agli umati di Al. I coefficienti di diffusione (**Tabella 6.2**) confermano che la complessazione con piccole quantità di Al (0.05% e 0.1%) aumenta la diffusione per l'intervallo tra 5.0 e 10.0 ppm (protoni su doppi legami e anelli aromatici), indicando una riduzione del volume idrodinamico. Ciononostante, i coefficienti di diffusione subiscono una riduzione graduale come risultato dell'aumento di Al, fino a un valore di  $D$  massimo di  $1.21 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  per il campione con coordinazione 1.0%, raggiungendo valori simili

agli umati di Ca. In questi complessi, l'aumento di  $D$  rispetto al controllo risulta modesto e non subisce variazioni significative con il contenuto di Ca. In relazione all'aumento delle concentrazioni di Al e Ca, il coefficiente di diffusione per i protoni alchilici ossigenati (2.5-5.0 ppm) si rivela mediamente inferiore al controllo, suggerendo un abbattimento progressivo delle dimensioni degli aggregati per questa categoria di sostanze. La regione corrispondente ai protoni non funzionalizzati (0.0-2.0 ppm) ha mostrato l'andamento opposto. La diffusione diminuisce in modo rilevante rispetto al controllo per entrambi gli umati di Al e Ca, indicando quindi che la complessazione ha aumentato le dimensioni di queste componenti alchiliche.

## 6.4 Discussione

Le condizioni sperimentali imposte sono tese a riprodurre le interazioni degli HA con i metalli nel loro contesto naturale. In prima analisi, valori di cationi superiori a 1.0% riferiti all'acidità della sostanza organica, valore massimo impiegato sperimentalmente, è piuttosto raro in campioni di HA purificati (Jansen *et al.*, 1996). In seconda analisi, le condizioni di acidità blanda (pH=5) è indispensabile per minimizzare la formazione di specie insolubili dell'alluminio, consentendo tuttavia una ionizzazione delle funzioni acide indispensabili per la coordinazione. Infine, i sali introdotti nelle soluzioni hanno minimizzato variazioni della forza ionica introdotte da Al e Ca, affinché i risultati non fossero influenzati da variazioni nel volume Donnan nei campioni (Kinniburgh *et al.*, 1996). La variazione massima di forza ionica nelle soluzioni, calcolata per i campioni a maggiore concentrazione di Al, infatti, è inferiore al 10%. In queste condizioni sperimentali, i risultati dipendono unicamente sulla conformazione degli umati in funzione dell'interazione con i metalli. I valori di  $T_{1\rho}(H)$  indicano che la rigidità molecolare di ciascuna classe di composti è nell'ordine: C alifatici > C aromatici/olefinici > C carbossilici (**Tabella 6.1**). Questo dato è in linea con riscontri precedenti che mostrano come la porzione alchilica del materiale organico delle HS è fortemente associato in aggregati idrofobici di grandi dimensioni

dotati di rigidità notevole, mentre i carboni ossigenati, essendo più solvatabili, hanno minore propensione a sviluppare compattezza, mostrando valori inferiori di  $T_{1\rho}(H)$  (Conte *et al.*, 2007; Smejkalova & Piccolo, 2008; Piccolo *et al.*, 2002).

La rigidità molecolare di tutte le componenti aumenta invariabilmente con la concentrazione di Al, leggermente meno con l'aumento di Ca. Mentre le interazioni di entrambi i cationi con gli HA sono prevalentemente elettrostatiche (Kinniburgh *et al.*, 1996), ioni alluminio trivalenti possono formare associazioni con funzioni anioniche più forti rispetto agli ioni calcio. Ciò potrebbe riflettere l'incremento diverso dei valori di  $T_{1\rho}(H)$  per gli umati di Al e Ca per le regioni carbossiliche e aromatiche/olefiniche dello spettro. E' probabile che gli acidi alcanoici saturi e insaturi, molto abbondanti nelle HS (Fiorentino *et al.*, 2006), formino preferenzialmente i complessi con i metalli, conferendo così stabilizzazione conformazionale e rigidità strutturale alle associazioni risultanti. Difatti, la stabilità intermolecolare introdotta dai complessi metallici potrebbe favorire le associazioni idrofobiche lungo le lunghe catene degli acidi grassi e giustificerebbe l'incremento dei valori di  $T_{1\rho}(H)$  nella regione alifatica dello spettro riscontrato nei campioni trattati con Al e Ca (**Tabella 6.1**).

I risultati associati ai valori di  $T_{1\rho}(H)$  sono complementari a quelli ottenuti da esperimenti NMR DOSY su umati di Al e Ca (**Tabella 6.2**). Questa è ulteriore riprova che non solo le conformazioni originali degli HA sono alterate dalla coordinazione dei cationi, anche la diffusione degli aggregati umici è influenzata dal contenuto di metalli. A valori più bassi di coordinazione con Al, la complessazione ha scompaginato le associazioni in aggregati di volume inferiore, probabilmente a causa di un riarrangiamento nel passaggio da interazioni idrofobiche deboli a più forti interazioni metalliche (Piccolo, 2001). Con l'aumento di disponibilità di ioni alluminio, aumentano anche fenomeni di *cross-linking* tra i siti di coordinazione ha aumentato le dimensioni degli aggregati e la loro diffusività è nuovamente diminuita. Questo comportamento è specialmente evidente per i complessi di Al nella regione aromatica/olefinica dello spettro NMR, mentre i valori

di diffusione per le regioni alchiliche ossigenate rimangono più alti rispetto al controllo anche per le aggiunte di Al più consistenti. Questi dati suggeriscono che le porzioni più ossigenate e idratate della sostanza organica disciolta non sono state particolarmente coinvolte in fenomeni di aggregazione indotti dall'introduzione dei complessi e mostrano quindi una mobilità notevole. Viceversa, la forte aggregazione indotta dalla complessazione dei metalli ha avuto l'effetto maggiore per le sostanze alifatiche spiccatamente idrofobiche, la cui diffusione è influenzata negativamente in funzione del contenuto di Al.

Gli umati di calcio mostrano risultati DOSY NMR sostanzialmente simili, nonostante l'effetto disruptivo è trascurabile per il campione a più basso contenuto (Ca 0.05%, **Tabella 6.2**), probabilmente per via dell'energia di legame più modesta di questo ione rispetto ad Al.

I risultati DOSY-NMR suggeriscono che gli l'architettura delle sostanze umiche non si comporta in modo statico, piuttosto essa è funzione delle dimensioni variabili delle aggregazioni molecolari in funzione del contenuto di metalli. In particolare, l'andamento della diffusione degli umati dei metalli rivela che le molecole contenenti carboni aromatici o olefinici, reagiscono con i metalli in modo differente, talvolta opposto, rispetto a quelle composte da lunghe catene alifatiche. Ciò implica che le molecole dell'HA non possono essere legate tra loro in modo covalente, ma piuttosto che esse si organizzano in associazioni supramolecolari, e rispondono di conseguenza alle variazioni chimiche introdotte dalla coordinazione dei metalli.

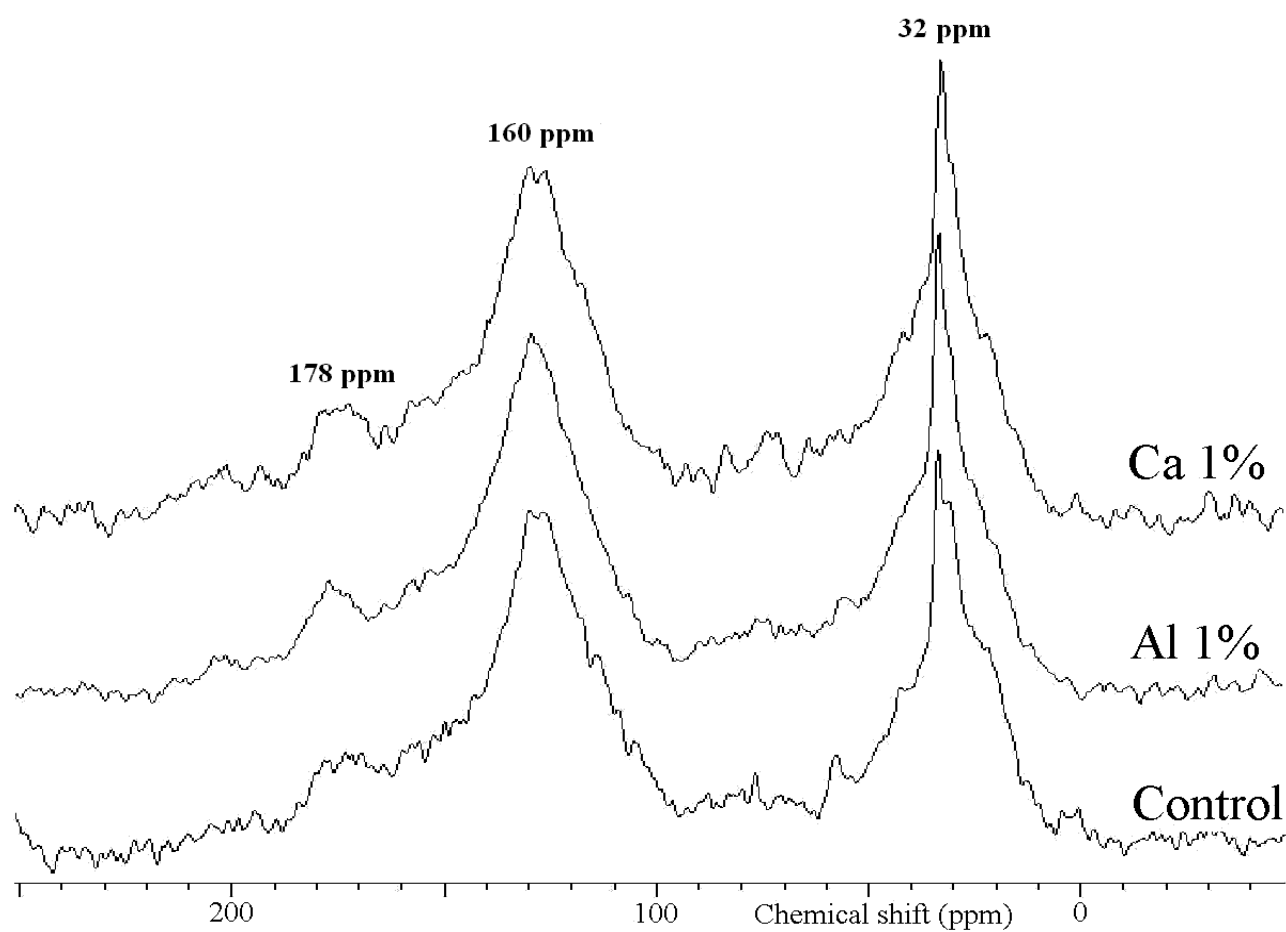
**Tabella 6.1:** Valori sperimentali di  $T_{1\rho}(H)$  ( $\mu s$ ) per le diverse regioni spettrali dei complessi metallo-umici di Ca e Al a diverse concentrazioni (deviazioni standard relative in percentuali)

Saturazione dei siti car- bossilici (%)	Intervallo spettrale $^{13}C$ (ppm)			
	Carbonili (185-150)	Aromatici/ Olefinici (150-95)	Alifatici (65-0)	Totali (185-0)
Control-0.00	2984 ( $\pm 5.1$ )	3807 ( $\pm 3.7$ )	4991 ( $\pm 2.5$ )	4079 ( $\pm 3.8$ )
Al-0.05	3550 ( $\pm 2.9$ )	4047 ( $\pm 2.7$ )	5106 ( $\pm 1.9$ )	4325 ( $\pm 2.5$ )
Al-0.10	3475 ( $\pm 3.7$ )	4459 ( $\pm 1.8$ )	5650 ( $\pm 1.3$ )	4691 ( $\pm 2.3$ )
Al-0.25	3577 ( $\pm 3.6$ )	4399 ( $\pm 4.2$ )	5428 ( $\pm 3.8$ )	4477 ( $\pm 3.9$ )
Al-0.50	3015 ( $\pm 3.2$ )	4496 ( $\pm 2.5$ )	5488 ( $\pm 1.4$ )	4502 ( $\pm 2.4$ )
Al-1.00	4274 ( $\pm 4.8$ )	4732 ( $\pm 1.5$ )	5580 ( $\pm 1.8$ )	4854 ( $\pm 2.7$ )
Ca-0.05	2883 ( $\pm 5.0$ )	4111 ( $\pm 3.1$ )	4980 ( $\pm 2.5$ )	4277 ( $\pm 3.5$ )
Ca-0.10	2589 ( $\pm 4.9$ )	4162 ( $\pm 2.9$ )	5143 ( $\pm 2.8$ )	4242 ( $\pm 3.5$ )
Ca-0.25	2795 ( $\pm 5.1$ )	4165 ( $\pm 1.8$ )	5117 ( $\pm 2.0$ )	4380 ( $\pm 3.0$ )
Ca-0.50	3064 ( $\pm 4.8$ )	4467 ( $\pm 2.3$ )	5078 ( $\pm 2.1$ )	4447 ( $\pm 3.1$ )
Ca-1.00	3197 ( $\pm 5.3$ )	4311 ( $\pm 2.7$ )	5278 ( $\pm 2.5$ )	4489 ( $\pm 3.5$ )

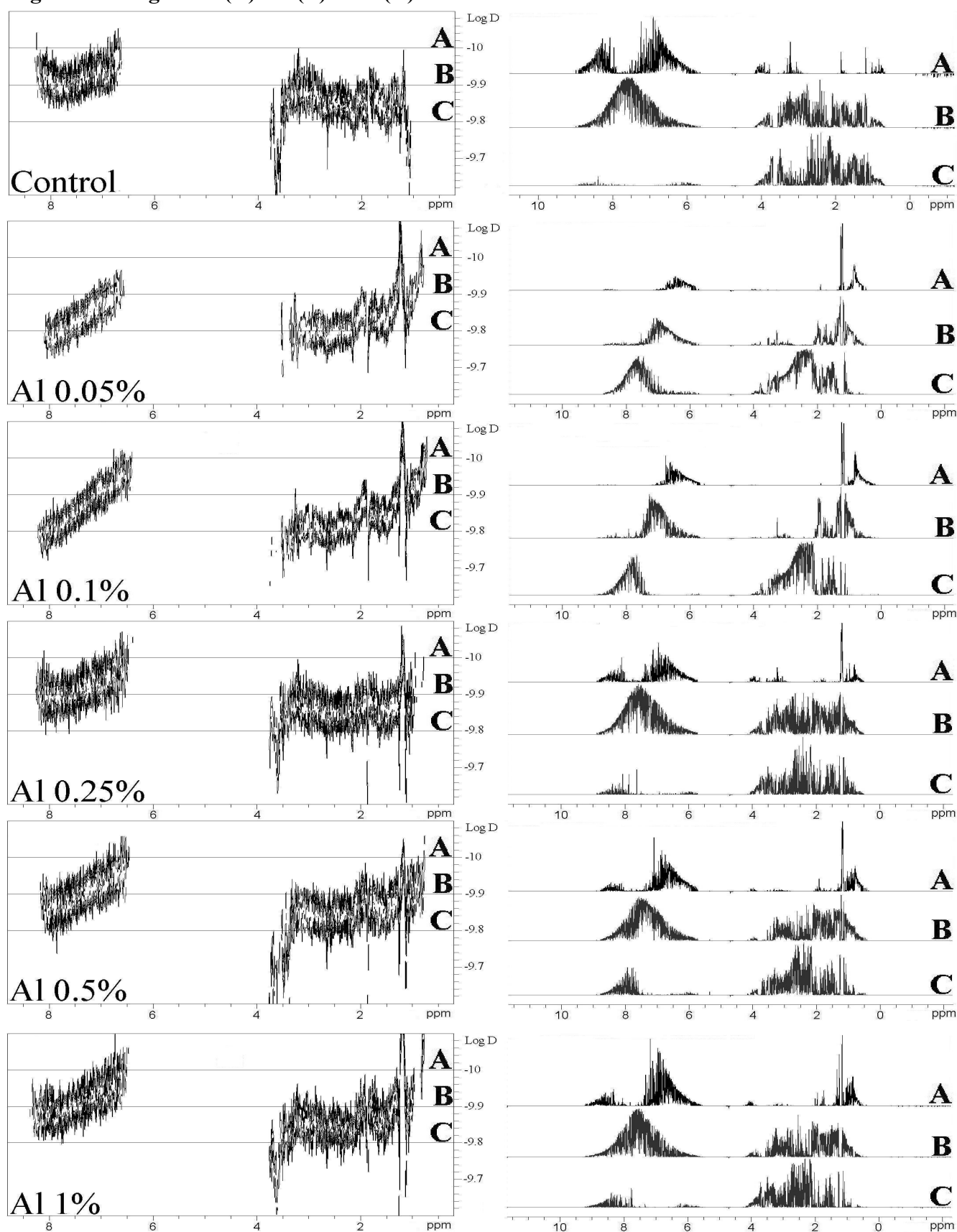
**Tabella 6.2:** Valori sperimentali dei coefficienti di diffusione  $D$  ( $\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) per le diverse regioni spettrali dei complessi metallo-umici di Ca e Al a diverse concentrazioni (deviazioni standard comprese tra  $0.01$  e  $0.20 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ )

Saturazione dei siti carbossilici (%)	Intervallo spettrale $^1H$ (ppm)		
	Aromatici/Olefinici (5.0-8.0)	Ossialchilici (2.0-4.5)	Alifatici (0.0-2.0)
Control-0.00	1.16	1.42	1.54
Al-0.05	1.45	1.68	1.32
Al-0.10	1.36	1.66	1.25
Al-0.25	1.18	1.43	1.37
Al-0.50	1.24	1.66	1.32
Al-1.00	1.21	1.50	1.26
Ca-0.05	1.24	1.54	1.24
Ca-0.10	1.20	1.49	1.27
Ca-0.25	1.24	1.51	1.31
Ca-0.50	1.23	1.49	1.04
Ca-1.00	1.22	1.48	1.26

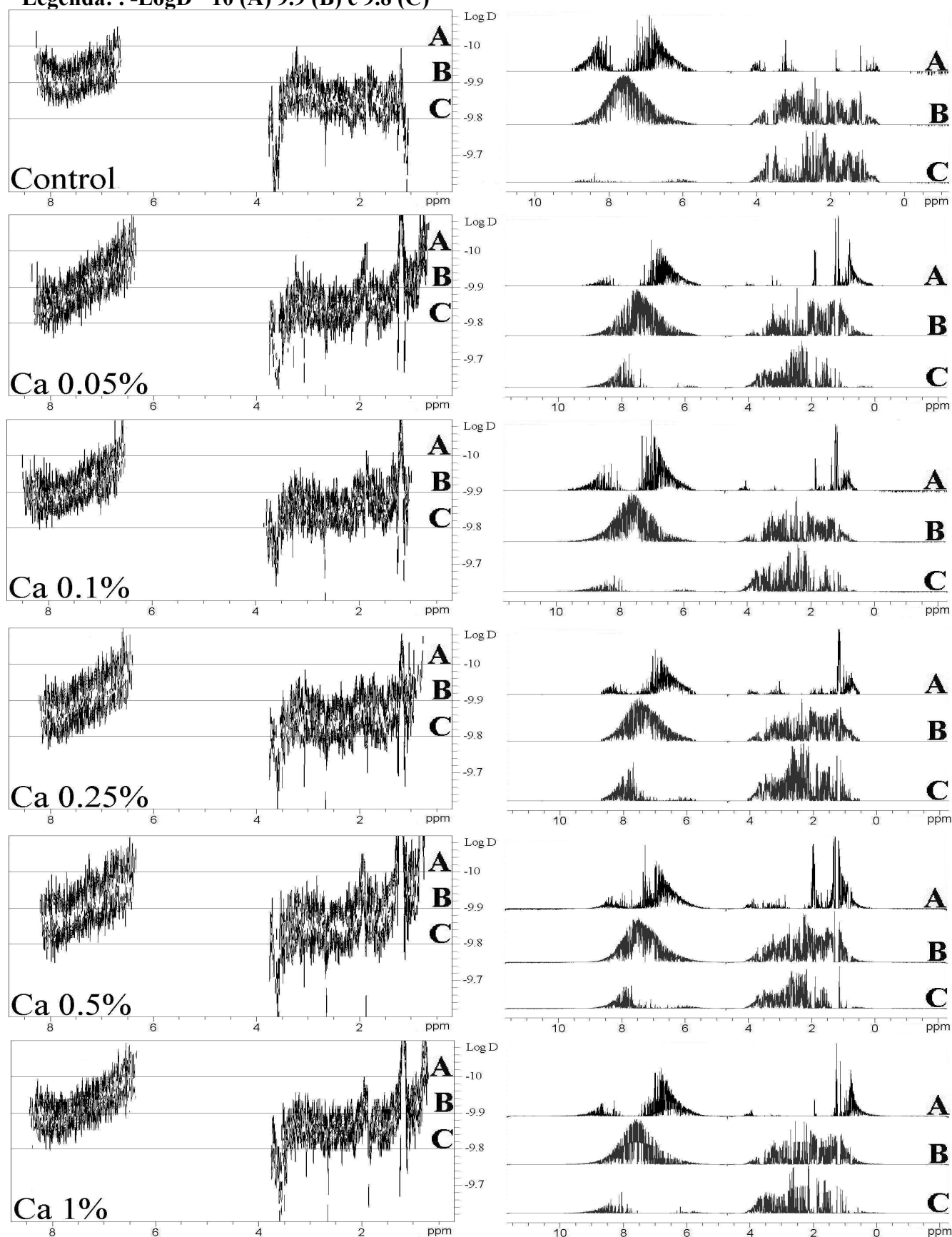
**Figura 6.1:** Spettri  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR dei complessi metalloumici a confronto. In basso: Non complessato, al centro: saturazione di 1% dei siti con Al, in alto: saturazione di 1% dei siti con Ca



**Figura 6.2:** Spettri DOSY di complessi Al-HA Lignite a confronto (ppm vs Log  $D$ ) (a sinistra) e rappresentazioni monodimensionali delle righe evidenziate (a destra)  
 Legenda: . -Log $D$ = 10 (A) 9.9 (B) e 9.8 (C)



**Figura 6.3: Spettri DOSY di complessi Ca-HA Lignite a confronto (ppm vs Log  $D$ ) (a sinistra) e rappresentazioni monodimensionali delle righe evidenziate (a destra)**  
**Legenda: -Log $D$ = 10 (A) 9.9 (B) e 9.8 (C)**





## CAPITOLO 7: Conclusioni

Attraverso il percorso di ricerca argomentato in questa tesi sono stati messi in risalto molti aspetti innovativi in relazione all'analisi chimica umici delle sostanze umiche.

L'elemento di principale novità è indubbiamente rappresentato dai risultati di spettrometria di massa HPSEC-ESI-Orbitrap-MS del campione di HA Vico come tale (**RES0**) e di alcune sue frazioni come la componente idrosolubile legata debolmente alla matrice (**ACQ2**), e il residuo finale inerte di frazionamento (**RES4**), incluse le dieci sottofrazioni di quest'ultimo. Infatti, i metodi di analisi MS di campioni di sostanze umiche, se analizzate senza essere sottoposte a procedimenti di omogeneizzazione e senza particolari accorgimenti analitici, tendono a rivelare un materiale a peso molecolare medio piuttosto alto (>1000 Da), con un certo grado di dispersione intorno a un valore di m/z massimo. Sia il valore medio che l'intervallo di dispersione di questa tipologia di spettro sono variabili di molti ordini di grandezza in funzione delle tecniche utilizzate. Operando sui parametri termici e potenziometrici dell'analisi ESI-MS si osservano risultati significativamente diversi (Piccolo & Spiteller, 2003), parallelamente, ampliando il discorso ad altre sorgenti di ionizzazione, sono riportate stime di peso molecolare medio di magnitudine molto superiore con ionizzazione a desorbimento laser (LDI) (Chilom *et al.*, 2008).

I risultati di questa tesi invece mostrano come l'ottimizzazione di alcuni parametri di analisi, principalmente: polarità dell'eluente, utilizzo a monte di separazione cromatografica a esclusione (HPSEC) e scelta della modalità di analisi dello strumento più selettiva; porti a tre risultati molto importanti: 1. la sostanza organica è rappresentabile come un insieme finito di sostanze; 2. il rapporto m/z di questi segnali non varia in misura rilevante in funzione dei parametri impostati per l'analisi; 3. i segnali hanno, nella maggior parte dei casi, un significato chimico concreto, rappresentato dalla loro formula bruta.

Questa nuova prospettiva risponde a due incongruenze associate all'analisi MS delle HS. In primo luogo le HS, per quanto eterogenee, sono composte da categorie ben definite di sostanze, come acidi alcanoici, acidi aromatici, alcani e carboidrati. Appare quindi improbabile che una miscela di sostanze ricche di analogie strutturali, per quanto complessa, generi una distribuzione di segnali continua. Se ciò fosse vero, ci si aspetterebbe la stessa continuità anche per l'analisi GC-MS di estratti di HS organosolubili, che sono invece caratterizzati da molecole ben caratterizzate (Grasset & Ambles, 1998b). In seconda istanza, la forma della distribuzione dei picchi  $m/z$  per gli spettri MS delle HS è anch'essa fonte di contraddizione. Un materiale composto da sostanze che formano delle serie di omologhi a PM crescente infatti dovrebbe mostrare un andamento discontinuo, essendo due omologhi distanziati da un numero di unità metileniche. Se invece si considerasse un oligomero come ad esempio un oligosaccaride, l'elemento discriminante sarebbe rappresentato dalle unità saccaridiche, distanziate quindi da più di 150 Da. Entrambi questi scenari sembrano molto poco compatibili con una distribuzione continua e omogenea.

Se ne deduce quindi, che l'analisi MS in assenza di particolari condizioni di analisi, non rivela strutture chimiche definite, ma piuttosto frammenti di aggregazioni supramolecolari con un numero non precisato di molecole di solvente ad accompagnarle. L'utilizzo della trappola orbitale limita questo fenomeno. Essa infatti sembra essere più efficiente nel rivelare molecole uniche vere e proprie che artefatti. Questa rivelabilità selettiva costituisce un elemento altamente innovativo per l'analisi delle HS.

Il campione di acidi unici **RES0**, è stato separato e analizzato nelle sue componenti principali ionizzabili senza trattamenti preliminari, se non la sua dissoluzione. Esso è composto principalmente da acidi alcanoici, idrossiacidi, diacidi, sostanze cicliche idrofile, acidi insaturi. L'analisi è rappresentativa quindi del 6% del peso del campione, un risultato positivo considerando che il metodo può essere ulteriormente sviluppato e che va anche tenuto conto che questo approccio non rivela le sostanze difficilmente ionizzabili come saccaridi, alcoli e idrocarburi.

L'analisi NMR allo stato solido di questo substrato è stata utilizzata come confronto, infatti questa tecnica è tra le più affidabili per la caratterizzazione delle sostanze organiche. Da questo raffronto si ha la conferma che la tecnica MS descritta è poco sensibile alle sostanze a struttura saccaridica e si deduce che la misurazione quantitativa delle sostanze lineari e cicliche tende a sovrastimare queste ultime.

Gli esperimenti condotti sulle frazioni organosolubili prodotte dal frazionamento chimico **ORG1**, **ORG2** e **ORG3**, analizzate per gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), anche hanno evidenziato l'impatto della tecnica SPE in silice e di condizioni di derivatizzazione diverse sui risultati. L'esito dell'analisi è infatti molto influenzato dalla preparazione del campione. L'utilizzo di piridina o dimetilformammide come cosolvente per la sililazione ha messo in evidenza un aumento di rivelabilità generale del materiale, rispetto all'uso del solo reagente sililante. Le sostanze contenenti ossidrili sono caratterizzate da un aumento di risposta, in particolare le sostanze poliossidrilate come zuccheri e acidi polifunzionali. Le sostanze prive di ossidrili, invece sembrano essere influenzate in modo ambiguo: si osserva, infatti, che per gli omologhi a sedici e diciotto termini, i più abbondanti hanno un aumento di risposta, mentre i membri della serie meno abbondanti non sono rivelati. L'utilizzo di supporti SPE in silice ha separato le sostanze in base alla polarità, con le più idrofile eluite più lentamente, senza alcuna ritenzione irreversibile del materiale. Tuttavia, ha portato ad una minore resa complessiva, non introducendo perciò alcun miglioramento rispetto alla SPE con supporto in aminopropile.

Alla luce dell'analisi degli spettri MS e NMR allo stato solido e in soluzione, gli estratti organici sono apparsi prevalentemente costituiti da sostanze lipofile, soprattutto alchiliche, e in misura minore da sostanze cicliche aromatiche e da carboidrati. L'estratto **ORG1** presenta un metabolita secondario di origine vegetale quale l'acido deidroabietico, di cui si osservano anche alcuni segnali NMR caratteristici, e tracce dell'aminoacido alanina. Le sostanze che compongono **ORG2** si distinguono invece per un contenuto maggiore in acidi idrossilati, carboidrati e acidi

aromatici. La componente **ORG3** è contraddistinta da una consistenza deliquescente, derivante da un'aggregazione meno compatta delle molecole, ed è composta prevalentemente da acidi alifatici, sostanze idrossilate e acidi aromatici, questi ultimi evidenziando sostituzioni molto variabili. Uno degli acidi aromatici in **ORG3**, l'acido dimetossimandelico, caratterizzato in MS, ha struttura fenilacetica, ed è caratteristico di questa frazione.

Uno dei prodotti di frazionamento più difficilmente caratterizzabili è costituito dalla frazione idrosolubile **ACQ2**. Questo substrato è stato analizzato con lo stesso approccio del materiale di partenza. Sebbene la resa di analisi sia molto bassa, questo approccio ha portato all'identificazione di numerose formule contenenti azoto, e molti composti che per formula e indice di insaturazione sono quasi sicuramente attribuibili a composti di tipo saccaridico. L'analisi NMR solida di **ACQ2** ha mostrato netta preponderanza di sostanze idrofile, caratterizzate da carboni ossigenati. Gli spettri in soluzione hanno confermato questo dato anche dal punto di vista dell'atomo di idrogeno, tuttavia questi spettri sono molto poco definiti.

Infine, il residuo finale del frazionamento sequenziale, **RES4**, ha evidenziato in esperimenti di HPSEC-ESI-Orbitrap-MS una composizione parzialmente alifatica e parzialmente insatura, con quest'ultima componente gravimetricamente più importante. Essa sembra essere composta da acidi organici di struttura difficilmente identificabile, essi sono sicuramente ciclici e ad alto contenuto di ossigeno, e potrebbero essere presenti in miscele di isomeri costituzionali. Lo spettro CPMAS-NMR della stessa frazione **RES4** ha confermato che la parte alifatica è meno abbondante dei composti con carbonio ad ibridazione  $sp^2$ . Il tempo di rilassamento  $T1\rho H$  "spin-lattice" delle regioni spettrali per questo materiale, a confronto con **RES0**, mostra che il frazionamento ha aumentato la compattezza degli aggregati. Questo fenomeno è attribuito all'estrazione progressiva durante il frazionamento del materiale alifatico dotato di maggiore mobilità spaziale, e che ha progressivamente arricchito il residuo di componenti insature più propense all'impilamento (stacking) degli orbitali  $\pi$  di doppi legami coniugati e/o aromatici. Lo spettro NMR in soluzione di

**RES4**, ha offerto purtroppo pochi elementi di valutazione, forse proprio per la forte aggregazione delle sue molecole e conseguente rapido rilassamento T1.

Dall'analisi delle frazioni di **RES4** separate con HPSEC preparativo, emerge invece che esse sono costituite da sostanze simili al materiale da cui sono state separate. Tuttavia, le frazioni a basso tempo di ritenzione (a dimensione molecolare apparentemente più grande) sono apparse più ricche in acidi alifatici, piuttosto che in aromatici rispetto a quelle con tempo di ritenzione maggiore (a dimensione molecolare apparentemente più piccola), e questi acidi alifatici sono costituiti da catene carboniose più lunghe. Inoltre, queste frazioni hanno un profilo NMR in soluzione più definito in seguito alla separazione. Infatti emerge che le frazioni a più grande dimensione molecolare apparente hanno una regione alifatica molto densa di segnali, mentre le frazioni più piccole mostrano maggior numero di segnali deschermati. Anche il profilo NMR di diffusione, analizzato spettroscopia con tecnica DOSY, mostra che i componenti delle frazioni separati per HPSEC sono meno fortemente aggregati. Essi rivelano coefficienti di diffusione molto diversi, indicando che le sostanze alifatiche sono ancora aggregate per effetto idrofobico, mentre le sostanze ossidrilate sono più libere di diffondere in soluzione. A confronto, il materiale **RES4** prima della separazione invece mostra un valore di diffusione molto più omogeneo, come se tutte le categorie di sostanze fossero organizzate nello stesso tipo di aggregato.

La spettroscopia NMR applicata alle HS ha quindi la duplice funzione di caratterizzare i segnali associandoli ai gruppi funzionali a cui appartengono, e di produrre informazioni sulla conformazione delle sostanze sia in soluzione che in fase solida. Queste possibilità sono state applicate allo studio della conformazione di HA da Lignite attraverso il confronto delle proprietà spettroscopiche di campioni a diverso contenuto di ioni alluminio e calcio. I risultati mostrano che l'andamento generale della rigidità è in accordo con la coordinazione, questo fenomeno è evidente per tutte le regioni spettrali, specialmente la regione aromatica, ed è molto più marcato per l'alluminio che per il calcio. La misura del coefficiente di diffusione invece mostra che le sostanze a

struttura alifatica sono influenzate negativamente dalla coordinazione, infatti la loro diffusione è sensibilmente diminuita, in misura maggiore per il calcio che per l'alluminio, mentre le regioni aromatiche e alchiliche ossigenate hanno subito un aumento di diffusività, che corrisponde a un raggio idrodinamico ridotto. Questa diminuzione è determinata da una disaggregazione causata dalla coordinazione dei cationi da parte della sostanza organica.

Attraverso questo percorso di ricerca, è emerso che l'effetto combinato del frazionamento estensivo della sostanza organica del suolo in associazione con l'analisi strumentale con le tecniche di NMR e MS più avanzate è un approccio valido. La prospettiva che ci si augura è di poter standardizzare il metodo per costruire delle librerie di composti che consentano di associare la composizione suoli della sostanza organica naturale alla loro attività biologica ed ambientale.

## Bibliografia

- Ahn M. Y., Dec J., Kim J. E., Bollag J. M., 2002. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J. Environ. Qual.* 31 pp. 1509–1515
- Almendros G., Guadalix M. E., González-Vila F. J., and Martín F., 1998. Distribution of structural units in humic substances as revealed by multi-step selective degradations and <sup>13</sup>C-NMR of successive residues. *Soil Biol. Biochem.* 30, pp. 755-765.
- Baiano S., 2006. “Caratterizzazione di frazioni a differenti dimensioni molecolari separate da un acido umico da suolo e di frazioni di compost a diversa polarità” Università Federico II
- Burges N. A., Hurst H. M., Walkden B. 1964. The phenolic constituents of humic acid and their relation to the lignin of the plant cover. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 28, pp. 1547-1552
- Cheshworth W., 2008. “Mineralogy and metal-humus complexes” in: *Encyclopedia of soil science*. Springer, pp. 39-45.
- Chilom G., Chilom O., Rice J. A., 2008. Exploring the high-mass components of humic acid by laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, pp. 1528-1532.
- Cohen Y., Avram L., Frish L., 2005. Diffusion NMR spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 44, pp. 520–554.
- Conte P., Spaccini R., Šmejkalová D., Nebbioso A., Piccolo A., 2007. Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acid., *Chemosphere*, 69, pp. 1032–1039.
- Engelbreton R. R., von Wandruszka R., 1994. Microorganization in dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.* 28, pp. 1934-1941.
- Fiorentino G., 2004. “Caratterizzazione molecolare di sostanze umiche da suolo vulcanico”. Università Federico II

- Fiorentino G., Spaccini R., Piccolo A., 2006. Separation of molecular constituents from a humic acid by solid-phase extraction following a transesterification reaction. *Talanta*, 68, pp. 1135-1142.
- Flaig W., 1966. "The chemistry of humic substances" in: *The use of isotopes in soil organic matter studies*. Report of FAO/IAEA Technical Meeting, Pergamon Press, New York, pp. 103-127.
- Flaig W., 1988. "Generation of model chemical precursor" in: *Humic substances and their role in the environment*. Frimmel F. H., Christman F. ed. , Wiley, New York, pp. 75-92.
- Flory P. J., Fox Jr, T. G., 1951, Treatment of intrinsic viscosities. *J. Am. Chem. Soc.*, 73 pp. 1904-1908
- Gonzalez-Vila F. J., Amblès A., del Río J. C., Grasset L.,
- Gosh K., Schnitzer M., 1980. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci.* 129, pp. 266-276.
- Grasset L., Amblès A., 1998a. Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 47, pp. 1-12.
- Grasset L., Amblès A., 1998b. Structure of humin and humic acid from an acid soil as revealed by phase transfer catalyzed hydrolysis, *Org. Geochem.* 29, pp. 881-891
- Grasset L., Amblès A., 1998c. Aliphatic lipids released from a soil humin after enzymatic degradation of cellulose. *Org. Geochem.*, 29, pp. 893-897.
- Gutiérrez A., del Río J. C., González-Vila F. J., Martín F., 1998. Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid -phase extraction and gas chromatography. *J. Chromatogr.* 823, pp. 449-455.
- Haider K., Martin J. P., Filip Z., 1975. "Humus biochemistry" in: *Soil biochemistry*.
- Paul E. A., Mc Larens ed., Marcel Dekker, New York, vol. 4, pp. 195-244.



- Hatcher P- G-, Spiker E. C., 1988. "Selective degradation of plant biomolecules" in Frimmel & Christman's Humic substances and their role in the environment. Wiley, New York, pp. 75-92.
- Hayes M. H. B., Swift R. S., 1978. "The chemistry of soil organic colloids" in: The chemistry of soil constituents. Greenland & Hayes ed., pp. 179-320.
- Hu Q., Noll R. J., Li H., Makarov A., Hardman M., Cooks R. G., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40, pp. 430-443.
- Hutta M., Góra R., 2003, Novel stepwise gradient reverse-phase liquid chromatography separations of humic substances, air particulate humic-like substances and lignins. *J. of Chromatography A*. 1012 pp. 67-79
- Jansen S., Paciolla M., Ghabbour E., Davies G., Varnum J. M., 1996, The role of metal complexation in the solubility and stability of humic acid. *Mater. Sci. Eng.*, 4, pp. 181-187.
- Johnson C. S. Jr., 1999. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 34, pp. 203–256.
- Jones M. N., Bryan N. D., 1998. Colloidal properties of humic substances. *Advances in Colloid and Interface Science*, 78 pp. 1-48.
- Kaneda T., 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 55, pp. 288-302.
- Kinniburgh D. G., Milne C. J., Benedetti M. F., Pinheiro J. P., Filius J., Koopal L. K., Van Riemsdijk W.H., 1996. Metal ion binding by humic acids: Application of the NICA-Donnan model., *Environ. Sci. Technol.*, 30, pp. 1687-1698.
- Kinniburgh D. G., van Riemsdijk W. H., Koopal L. K., Benedetti M. F., 1998. "Ion binding to humic substances: Measurements, Models and Mechanisms" in Jenne E. A.'s: Adsorption of metals by geomedia, Academic Press pp. 484-517.
- Kleinhempel D., 1970 Albrecht Thear Archives, 14 pp.3-14

- Kolattukudy P.E., Kronman K., Poulou A.J., 1975. Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry *Plant Physiol.* 55 pp. 567-573
- Kononova M. M., 1966, "Soil organic matter" Pergamon, Oxford.
- Qian K., Edwards K. E., Dechert, G. J., Jaffe S. B., Green L. A., Olmstead W. N., 2008. Measurement of Total Acid Number (TAN) and TAN Boiling Point Distribution in Petroleum Products by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 3, pp. 849-855.
- Leenheer J. A., Rostad C. E., Gates P. M., Furlong E. T., Ferrer I., 2001. Molecular resolution and fragmentation of fulvic acid by electrospray ionization/multistage tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 73, pp. 1461-1471.
- Manahan S. E., 2001. "The geosphere and Geochemistry" in: *Fundamentals of environmental chemistry*. CRC Press, pp. 575 610.
- McBrierty V. J., 1989 In "Comprehensive Polymer Science"; Vol. 1, Allen, G., Ed. Pergamon Press, Oxford, U.K. Pp 397-428.
- McIntyre C., Batts B. D., Jardine D. R., 1997. Electrospray mass spectrometry of groundwater organic acids. *J. Mass Spectrom.* 32 pp. 328-330.
- Newman R. H., Condon L. M., 1995. Separating subspectra from cross-polarization magic angle-spinning nuclear-magnetic-resonance spectra by proton spin relaxation editing. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 4, pp. 259-266.
- Piccolo A., Conte P., Cozzolino A., 1999. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *European J. Soil Sci.* 50, pp. 687-694.
- Piccolo A., Conte P., Cozzolino A., 2000. "Differences in high performance size exclusion chromatography between humic substances and macromolecular polymers" in: *Humic*

- substances: versatile components of plants, soil and water. Ghabbour E. A., Davies G. ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 111-124.
- Piccolo A., 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* 166, pp. 810-832.
- Piccolo A., Cozzolino A., Conte P., 2001. Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances as compared to macromolecular polymers. *Soil Sci.* 166, pp. 174-185.
- Piccolo A., 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* 75, pp. 57-134.
- Piccolo A., Conte P., Trivellane E., Van Lagen B., Buurman P., 2002. Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by PYR-GC-MS and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 36, pp. 76-84.
- Piccolo A., Spiteller M., 2003. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Anal. and Bioanal. Chem.* 377, pp. 1047-1059.
- Ponte K. J., 2003. "Retaining soil moisture in the american south-west". Sunstone Press, pp.53-60.
- Schnitzer M., 1972. "Humic substances in the environment". Marcel Dekker, New York.
- Schoening I. , Kogel-Knabner I., 2006. Chemical composition of young and old carbon pools throughout Cambisol and Luvisol profiles under forests. *Soil Biol. Biochem.*, 38, pp. 2411-2424.
- Simpson A., Kingery W. L., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P., Kerssebaum R., 2001 Separation of structural components in soil organic matter by diffusion ordered spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 35, pp. 4421–4425.
- Simpson A. J., 2002. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 40, pp. S72-S82.

- Šmejkalová D., Piccolo A., 2008. Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered spectroscopy (DOSY-NMR). *Environmental Science and Technology*, 42, pp. 699-706.
- Spaccini R., Piccolo A., Conte P., Haberhauer G., Gerzabek M. H., 2000. Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by  $^{13}\text{C}$  distribution and CPMASNMR spectra. *European J. Soil Sci.* 51, pp. 583-594.
- Stejskal E. O., Memory J. D., 1994. "High-resolution NMR in the solid state". Oxford University Press: New York, pp 1-186.
- Stenson A. C., Landing W. M., Marshall, A. G., Cooper, W. T., 2002. Ionization and fragmentation of humic substances in electrospray ionization fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry *Anal. Chem.* 74 pp. 4397-4409.
- Stenson A. C., Marshall A. G., Cooper W. T., 2003. Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee river fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra. *Anal. Chem.* 75, pp. 1275-1284.
- Stevenson F. J., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, and reactions*. 2nd ed. Wiley-Intersci., New York.
- Tan K. H., 1998. "Spectral characteristics of humic compounds" in: *Principles of soil chemistry*. CRC Press, pp. 146-158.
- Tipping E., 2002. "Cation-Humic binding and other physico-chemical properties" in: *Cation Binding to Humic Substances*. Cambridge University Press, pp. 262-287.
- Ussiri D. A. N., Johnson C. E., 2007. Organic matter composition and dynamics in a northern hardwood forest ecosystem 15 years after clear-cutting. *Forest Ecology and Management*. 240, pp. 131-142.
- Waksman S. A., 1932. "Humus". Williams and Wilkins, Baltimore.

- Wershaw R. L., 1986. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil water and sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.* 1, pp. 29-45.
- Whelan T. J., Shallikerr. A., McIntyre C., Wilson M.A., 2005. Development of a multidimensional High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation for Bayer humic hubstances. *In. Eng. Chem. Res.* 44 pp. 3229–3237.
- Wilson M. A., 1987. *NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry*, 1st edn., Pergamon Press, London